

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE
INDIRIZZO IN SCIENZE IMMUNOLOGICHE E REUMATOLOGICHE

XVII Ciclo – 2002 - 2006

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

TESI DI DOTTORATO

IL RUOLO DELLE FOSFOLIPASI A₂ SECRETORIE
E DEI LORO RECETTORI NELLA ATTIVAZIONE
DEI MACROFAGI POLMONARI UMANI

TUTORE

Chiar.mo

Prof. Massimo Triggiani

CANIDATO

Dott. Francescopaolo Granata

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	<i>pag. 1</i>
MATERIALI E METODI	
▪ <u>Reagenti e tamponi</u>	<i>pag. 11</i>
▪ <u>Isolamento e purificazione dei macrofagi polmonari Umani (HLM)</u>	<i>pag. 12</i>
▪ <u>Incubazioni cellulari</u>	<i>pag. 13</i>
▪ <u>Dosaggi ELISA di citochine e chemochine</u>	<i>pag. 14</i>
▪ <u>Espressione dell'mRNA per TNF-α e IL-8</u>	<i>pag. 14</i>
▪ <u>Espressione del recettore per sPLA₂ di tipo M</u>	<i>pag. 16</i>
▪ <u>Analisi della fosforilazione delle chinasi mediante western blot</u>	<i>pag. 18</i>
▪ <u>Analisi statistica</u>	<i>pag. 19</i>
RISULTATI	
▪ <u>Effetto delle sPLA₂ sulla produzione di citochine e chemochine negli HLM</u>	<i>pag. 20</i>
▪ <u>Ruolo dell'attività enzimatica delle sPLA₂ nella produzione di citochine e chemochine negli HLM</u>	<i>pag. 22</i>
▪ <u>Espressione del recettore tipo M sugli HLM</u>	<i>pag. 24</i>
▪ <u>Effetto di Me-Indoxam sulla produzione di citochine e chemochine indotta dalle sPLA₂ negli HLM</u>	<i>pag. 26</i>

- *Ruolo di p38 e ERK1/2 nella produzione di citochine e chemochine indotta dalla sPLA₂ negli HLM* pag. **28**
- *Ruolo di PI3K nella produzione di citochine e chemochine indotta dalla sPLA₂ negli HLM* pag. **30**
- *Ruolo di NF- κ B nella produzione di citochine e chemochine indotta dalla sPLA₂ negli HLM* pag. **32**
- *Possibili collegamenti trasduzionali negli HLM attivati dalle sPLA₂* pag. **33**

DISCUSSIONE pag. **35**

PUBBLICAZIONI CORRELATE pag. **42**

BIBLIOGRAFIA pag. **43**

FIGURE pag. **60**

TABELLA pag. **80**

INTRODUZIONE

Le fosfolipasi A₂ (PLA₂) sono enzimi che catalizzano l'idrolisi degli acidi grassi dalla posizione *sn*-2 dei fosfolipidi costituenti le membrane cellulari. Questa reazione genera acidi grassi liberi e lisofosfolipidi che rappresentano i substrati di partenza per la sintesi di due importanti classi di mediatori lipidici [1, 2]. Infatti, nella maggior parte dei casi, l'acido grasso esterificato nella posizione *sn*-2 delle varie classi di fosfolipidi è rappresentato dall'acido arachidonico (AA) che una volta libero viene metabolizzato attraverso due vie biosintetiche: la via delle lipossigenasi che conduce alla sintesi dei leucotrieni e la via delle cicloossigenasi che determina la formazione di prostaglandine e trombossani [3]. Leucotrieni, prostaglandine e trombossani nel loro insieme costituiscono gli eicosanoidi, una famiglia di mediatori chimici di natura lipidica che esercitano importanti effetti biologici su molteplici funzioni cellulari e d'organo [4]. Ad esempio, queste molecole intervengono nella modulazione del tono vascolare agendo come vasodilatatori (Prostaglandina I₂, PGI₂) o vasocostrittori (Trombossano A₂, TxA₂); partecipano alla modulazione dell'aggregazione piastrinica come antiaggreganti (PGI₂) o proaggreganti (TxA₂); regolano il tono della muscolatura bronchiale come broncocostrittori (PGD₂ e cisteinil-leucotrieni) o broncodilatatori (PGE₂) [5]. D'altra parte, i lisofosfolipidi costituiscono il substrato di partenza per la sintesi dei fosfolipidi 2-acetilati, di cui il principale rappresentante è il *Platelet-activating Factor* (PAF), una molecola che esercita numerose attività biologiche ed è dotato di una spiccata attività proinfiammatoria [6].

Molteplici PLA₂ sono state caratterizzate e clonate nel corso degli ultimi dieci anni ([Tabella I](#)). Attualmente, le PLA₂ vengono classificate in 12 diversi gruppi che a loro volta includono diversi sottogruppi per un totale di oltre 20 diverse molecole con

attività PLA₂ che differiscono tra loro per sequenza aminoacidica, localizzazione cellulare e dipendenza dallo ione Ca²⁺ come cofattore per l'attività enzimatica[7]. Secondo la classificazione corrente le PLA₂ sono identificate da un acronimo formato da una lettera minuscola che rappresenta la specie di provenienza (h: *human*; m: *mouse*) seguita dalla lettera "G" e da un numero romano indicativo del gruppo ed, eventualmente, da una lettera maiuscola che individua il sottogruppo. Ad esempio, la PLA₂ umana di gruppo IB è indicata dall'acronimo hGIB. Le PLA₂ sono classicamente distinte in PLA₂ citosoliche (cPLA₂) e PLA₂ secretorie (sPLA₂). Le cPLA₂ sono enzimi ad alto peso molecolare (80-110 kDa) presenti nel citoplasma e, per la loro attività enzimatica, richiedono concentrazioni micromolari di Ca²⁺ che si raggiungono all'interno delle cellule durante i processi di attivazione [8]. Viceversa, le sPLA₂ sono molecole di basso peso molecolare (12-16 kDa) localizzate nei granuli citoplasmatici e secrete nell'ambiente extracellulare dove trovano le concentrazioni millimolari di Ca²⁺ necessarie per la loro attività enzimatica [9]. Attualmente sono state identificate 12 diverse isoforme di sPLA₂ che sono state classificate come GIB, GII (sottogruppi da A ad F), GIII, GV, GX e GXII (sottogruppi A e B) ([Tabella I](#)).

La presenza delle cPLA₂ è pressoché ubiquitaria nelle cellule di mammifero, mentre l'espressione delle sPLA₂ può variare in maniera significativa da cellula a cellula e da tessuto a tessuto. Inoltre, nell'ambito della stessa cellula o tessuto, l'espressione delle diverse isoforme di sPLA₂ può modificarsi a seconda delle condizioni fisiopatologiche [7, 10-13]. Nell'uomo la secrezione delle diverse sPLA₂ avviene sia da parte di cellule residenti nei tessuti (cellule epiteliali, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, mastociti, macrofagi, etc.) che di cellule immunocompetenti del sangue periferico che infiltrano i tessuti durante le risposte immunitarie (basofili, neutrofili, eosinofili, monociti, linfociti) ([Tabella I](#)). Tuttavia, mentre la

caratterizzazione del profilo di espressione delle sPLA₂ a livello tissutale è in fase avanzata, il profilo di espressione delle diverse isoforme a livello cellulare non è stato ancora definito essendo ancora in una fase iniziale. Ad oggi, un solo studio condotto sui neutrofili umani ha analizzato il profilo di espressione completo delle varie isoforme di sPLA₂ finora identificate [14]

Il fatto che le sPLA₂ vengano secrete ha permesso l'identificazione di queste molecole in diversi fluidi biologici. Infatti, le sPLA₂ sono state inizialmente isolate dal veleno di serpenti come il cobra (svGIA) e di insetti come l'ape (bvGIII) e, successivamente dal secreto pancreatico di mammiferi (GIB) [15, 16]. Per tale motivo, fu inizialmente prospettato che il ruolo funzione principale delle sPLA₂ fosse limitata alla digestione dei lipidi, una funzione strettamente dipendente dalla attività enzimatica di queste molecole. In seguito, studi condotti sulle sPLA₂ presenti nei veleni di serpenti e insetti evidenziarono che oltre alle funzioni digestive queste molecole esercitavano anche effetti tossici su alcuni tessuti come quello nervoso e quello muscolare [17]. Inoltre, nel 1989, fu caratterizzata una sPLA₂ diversa da quella pancreatica GIB che fu classificata come GIIA e fu isolata simultaneamente dalle piastrine umane [18] e dal liquido sinoviale di pazienti affetti da artrite reumatoide [19]. Queste osservazioni suggerirono che le sPLA₂ potessero esplicare diverse funzioni e, soprattutto, che esse potessero svolgere un ruolo nella patogenesi dell'infiammazione.

Numerosi studi condotti nelle ultime due decadi hanno dimostrato che le sPLA₂ vengono secrete in numerosi altri fluidi biologici di natura infiammatoria [20]. Infatti, la presenza delle sPLA₂ è stata riportata non soltanto a livello sinoviale nei pazienti con artrite reumatoide [19], ma anche nelle vie aeree di donatori sani [21] e di pazienti con diverse patologie del polmone (polmoniti, ARDS, sarcoidosi ed asma bronchiale) [22-27], nel seno coronarico di pazienti con ischemia miocardica [28] e nella mucosa

intestinale dei pazienti con morbo di Crohn o rettocolite ulcerosa [29-31]. Inoltre, livelli elevati di sPLA₂ sono stati riscontrati nel plasma di pazienti affetti da patologie infiammatorie a carattere sistemico quali la pancreatite acuta [32], lo shock settico [33], l'ARDS [34], le ustioni estese [35] e l'insufficienza multiorgano (MOF) [36]. In tutte queste patologie i livelli plasmatici di sPLA₂ sono significativamente correlati con la severità, la prognosi e la mortalità [26, 32, 33, 35-37].

L'osservazione che le sPLA₂ vengono prodotte e secrete in elevate quantità in corso di reazioni infiammatorie ha condotto all'ipotesi che esse possano svolgere un ruolo rilevante nei meccanismi della flogosi. Quest'ipotesi è supportata da numerose osservazioni *in vivo* che indicano che la somministrazione di sPLA₂ esogene nell'animale da esperimento induce una intensa reazione infiammatoria. Ad esempio, l'iniezione intrarticolare o intradermica di sPLA₂ (GIA e GIB) nel coniglio induce una reazione infiammatoria acuta nel sito di iniezione che si associa a danno tissutale nell'articolazione e nella pelle, rispettivamente [38, 39]. Inoltre, la instillazione intratracheale delle stesse sPLA₂ nel porcellino d'india determina una polmonite caratterizzata da una intensa infiltrazione di neutrofili che ha caratteristiche istopatologiche analoghe a quelle osservate in corso di ARDS [40, 41]. Infine, la infusione endovenosa di sPLA₂ nei ratti e nei cani causa una sindrome del tutto simile a quella che si osserva in corso di shock settico [42].

Come accennato in precedenza, l'idrolisi dell'AA è la prima reazione enzimatica delle vie metaboliche che determinano la biosintesi delle due principali classi di mediatori lipidici dell'infiammazione: eicosanoidi e PAF. Di conseguenza, fu proposto che il principale meccanismo attraverso il quale le sPLA₂ esplicano il loro effetto proinfiammatorio fosse legato alla loro intrinseca capacità di generare substrati disponibili per la sintesi dei mediatori lipidici. Tuttavia, crescenti evidenze sperimentali

indicano che le sPLA₂ sono in grado di esercitare altri effetti biologici che possono essere rilevanti per l'induzione ed la modulazione delle reazioni infiammatorie [43]. In particolare, è stato riportato che le sPLA₂ sono in grado di attivare alcune funzioni cellulari e di indurre nelle cellule infiammatorie la produzione mediatori chimici diversi dagli eicosanoidi e dal PAF. Ad esempio, alcune sPLA₂ (GIA, GIB, GIIA, GIII) inducono nelle cellule infiammatorie la esocitosi [44-47], l'espressione di molecole di superficie [46, 48-51], la chemiotassi [52-54] e la produzione citochine [46, 47, 55], chemochine [46, 56, 57] ed ossido nitrico [58-60]. Studi successivi hanno anche riportato che le sPLA₂ determinano l'attivazione di sistemi intracellulari di trasduzione del segnale che generano secondi messaggeri come l'aumento delle concentrazioni dello ione Calcio (Ca²⁺), causano la fosforilazione di chinasi come le MAP chinasi, e inducono l'attivazione di fattori di trascrizione nucleari come NF-kB [61]. Pertanto, il ruolo delle sPLA₂ nelle reazioni infiammatorie appare molto più complesso di quanto originariamente prospettato.

Un ulteriore livello di complessità nello studio delle sPLA₂ è dato da alcune osservazioni sperimentali che evidenziano come alcuni effetti delle sPLA₂, sia in vivo che in vitro, sono indipendenti dalla loro attività enzimatica. In particolare è stato osservato che:

- 1) l'iniezione intraarticolare o intradermica di sPLA₂ enzimaticamente inattivate in animali da esperimento riproduce, anche se in maniera attenuata, le reazioni infiammatorie causate dagli enzimi attivi [38, 39];
- 2) inibitori dell'attività enzimatica delle sPLA₂ non bloccano alcuni degli effetti proinfiammatori di queste molecole sia *in vitro* che *in vivo* [62];
- 3) alcune sPLA₂ dotate di attività proinfiammatoria, *in vitro*, non sono in grado di mobilitare l'AA dalle cellule intatte [55, 63];

4) sPLA₂ private dell'attività enzimatica attraverso mutazioni del sito catalitico riproducono, *in vitro*, gli stessi effetti delle sPLA₂ native [64-66].

Queste osservazioni indicano chiaramente che l'attività enzimatica delle sPLA₂ non è l'unico meccanismo con il quale queste molecole possono partecipare alle reazioni infiammatorie [62].

Studi condotti nell'ultimo decennio hanno dimostrato che le sPLA₂ possiedono la capacità di interagire con alcune molecole presenti sulla membrana cellulare [67]. Questa importante scoperta ha generato l'ipotesi che le sPLA₂ potessero funzionare come mediatori extracellulari oltre che come enzimi. I siti di membrana con i quali possono interagire le sPLA₂ includono alcune proteine appartenenti a diverse famiglie di molecole di superficie. Infatti, le sPLA₂ possono legarsi ad alcuni proteoglicani contenenti eparan-solfato (HSPG) come il glicano [68], il biglicano [69] e la decorina [70], ma soprattutto a recettori di membrana specifici per le sPLA₂ (recettore tipo M e recettore tipo N) [71]. Tuttavia, è importante sottolineare che mentre l'interazione con gli HSPG facilita l'interazione delle sPLA₂ con i fosfolipidi di membrana e quindi esalta la loro attività catalitica [7], le conseguenze dell'interazione delle sPLA₂ con i loro recettori sono in gran parte sconosciute e quindi il ruolo dei recettori delle sPLA₂ nelle reazioni infiammatorie resta tutto da stabilire.

Nei mammiferi, la prima osservazione della interazione delle sPLA₂ con siti di legame specifici venne da studi condotti utilizzando sPLA₂ isolate da veleno di serpente (svGIA) e di ape (bvGIII) [71]. Questi studi dimostrarono che i principali effetti di queste sPLA₂ (neurotossicità e miotossicità) erano dovuti all'interazione con due recettori strutturalmente e biochimicamente distinti che vennero denominati recettore tipo N (*Neuronal type*) ed il recettore tipo M (*Muscular type*) a seconda del tessuto in cui furono identificati per la prima volta. Il recettore tipo N è stato inizialmente

individuato nel sistema nervoso di ratto ed è fortemente espresso nel cervello di tutti i mammiferi [72]. Il recettore è dotato di due diversi siti ad alta affinità che legano le sPLA₂ neurotossiche presenti nei veleni di serpenti ed insetti (es. GIA e GIII), ma non le sPLA₂ di mammifero (es. GIB, GIIA, etc.) [67]. Il recettore è costituito da tre subunità di 36 kDa, 51 kDa e 85 kDa, ma ad oggi non è stato ancora clonato. È verosimile che il recettore tipo N svolga un ruolo determinante nell'eccitabilità neuronale e nella neurotossicità indotta dalle sPLA₂ presenti nei veleni di serpente sia a livello del sistema nervoso centrale che di quello periferico [71]. A questo proposito, studi molto recenti hanno identificato un sottogruppo di recettori di tipo N che potrebbero essere coinvolti nella neurotossicità centrale delle sPLA₂ neurotossiche [66]. D'altra parte, recettori ad alta affinità simili, ma non identici al recettore tipo N, sono stati descritti in tessuti diversi dal cervello come il polmone, il fegato, il cuore ed il rene [72, 73]. Tuttavia, non è chiaro se questi recettori siano coinvolti nella neurotossicità periferica delle sPLA₂ dei serpenti o se questi recettori possano svolgere un ruolo diverso da quello dei recettori presenti a livello cerebrale.

Il secondo recettore, denominato tipo M poiché fu caratterizzato nel muscolo scheletrico di coniglio [74], è stato successivamente descritto in numerosi altri tessuti tra cui il fegato, il cuore, il rene e soprattutto il polmone [75]. A differenza del recettore tipo N, il recettore tipo M è stato clonato in diverse specie di mammiferi incluso l'uomo [76, 77]. Questo recettore di membrana è costituito da una sola subunità di ~180 kDa [77] che presenta circa il 30% di omologia con il recettore del mannosio, espresso preferenzialmente sui macrofagi ed appartenente ad una famiglia di recettori che presentano analogie strutturali e sono coinvolti nell'endocitosi di glicoproteine batteriche e nella presentazione dell'antigene [78]. A questa famiglia appartengono anche il DEC-205/gp200-MR6 che è espresso sulle cellule dendritiche [79] e il recettore

Endo180/uPARAP che è presente sui fibroblasti e sulle cellule endoteliali [80]. Tutti i membri della famiglia del recettore del mannosio sono glicoproteine costituite da una regione extracellulare amino-terminale ricca di cisteine cui segue un dominio simile alla fibronectina tipo II (FNII) e quindi 8-10 domini simili alla lectina tipo C (CTLD) [78]. I recettori sono ancorati alla membrana da un singolo dominio transmembrana cui segue una breve coda citoplasmatica all'estremità carbossi-terminale ricca di residui di tirosina. Caratteristicamente il recettore tipo M presenta 8 domini CTLD che sono coinvolti nel legame con le sPLA₂ e ha capacità endocitiche del tutto analoghe agli altri membri della famiglia [71]. Studi condotti con esperimenti di mutagenesi e di *binding* hanno dimostrato che: (1) il dominio CTLD5 è fondamentale per il legame delle sPLA₂ [81]; (2) i residui aminoacidici delle sPLA₂ che si trovano nelle immediate vicinanze oppure all'interno del sito di legame del Ca²⁺ sono coinvolte nel legame al recettore tipo M [82]; (3) il legame delle sPLA₂ al recettore tipo M determina l'inibizione della attività enzimatica delle sPLA₂ [83]; (4) il recettore tipo M viene rapidamente internalizzato in seguito al legame con la sPLA₂ ed è capace di riciclare tra la membrana plasmatica e il compartimento endosomiale, probabilmente attraverso un meccanismo mediato dalla clatrina [84]. Il recettore tipo M presenta un solo sito di legame per le sPLA₂ ed ha un profilo di *binding* completamente diverso da quello del recettore tipo N. Infatti, il recettore tipo M ha alta affinità per le sPLA₂ di mammiferi come la GIB, la GIIA e la GX, mentre non lega alcune sPLA₂ presenti nei veleni dei rettili e degli insetti come la GIII [85, 86]. Inoltre, sono state identificate due varianti del recettore tipo M di cui una corrispondente al recettore completo espresso sulla membrana cellulare e la seconda codificante per una forma di recettore che viene secreta nell'ambiente extracellulare [76]. Sebbene alcune osservazioni suggeriscono un ruolo inibitorio del recettore tipo M sull'attività delle sPLA₂ [75], altri studi hanno ipotizzato che il legame

della sPLA₂ al recettore tipo M attivi le cellule bersaglio ed esalti l'attività proinfiammatoria delle sPLA₂ [61]. Pertanto, il ruolo del recettore tipo M nelle patologie infiammatorie associate ad elevati livelli di sPLA₂ resta ancora controverso.

Una osservazione interessante confermata da studi condotti da diversi gruppi di ricerca è che il recettore tipo M è espresso ad alti livelli nel polmone umano [76, 87], che rappresenta un sito di accumulo preferenziale delle sPLA₂. Infatti, è noto da diversi anni che una attività sPLA₂ è rilevabile nel lavaggio broncoalveolare (BAL) di individui normali [21] e che i livelli di sPLA₂ sono notevolmente aumentati nel BAL di pazienti con patologie infiammatorie del polmone [22-27]. Ad esempio, nei pazienti asmatici i livelli di sPLA₂ nel BAL sono 3-5 volte più elevati rispetto ai pazienti di controllo non asmatici [25, 88] ed in corso di ARDS tali livelli possono aumentare anche fino a cento volte [26]. Inoltre, studi recenti condotti con tecniche di immunoistochimica hanno evidenziato che a livello del polmone umano sono presenti ben 7 diverse isoforme di sPLA₂ ([Tabella I](#)) la cui espressione aumenta in corso di reazioni infiammatorie [13, 89]. In particolare, sono presenti in quantità elevate soprattutto le sPLA₂ GIB, GIIA e GX che rappresentano ligandi ad alta affinità del recettore tipo M, almeno nella specie murina [86]. Una ovvia implicazione della presenza simultanea di livelli elevati di sPLA₂ e di recettore tipo M nelle vie aeree umane è la possibilità di interazione su potenziali cellule bersaglio. Tuttavia, mentre l'origine cellulare delle sPLA₂ a livello polmonare viene caratterizzata proprio in questi anni [86], le cellule bersaglio in grado di esprimere il recettore tipo M sulla membrana non sono ancora state individuate.

I macrofagi sono cellule immunitarie ampiamente rappresentate in diversi organi e tessuti umani (ad es. polmone, fegato, midollo, sinovia, etc.) dove svolgono un ruolo fondamentale nella induzione e mantenimento delle risposte infiammatorie ed immuni [90]. In particolare, i macrofagi rappresentano le cellule immunitarie predominanti nelle

vie aeree sia degli individui normali che dei pazienti con diverse patologie a carico dell'apparato respiratorio [91]. Nel polmone i macrofagi svolgono un ruolo predominante in tutte le fasi della risposta immune e questo avviene soprattutto attraverso la produzione di numerose mediatori (preformati o sintetizzati *de novo*) tra i quali enzimi lisosomiali, mediatori lipidici, citochine, chemochine e metalloproteinasi [92]. La produzione di queste molecole da parte dei macrofagi si verifica nella maggior parte dei casi in seguito alla attivazione di recettori di membrana di cui i macrofagi possiedono un vasto repertorio [93]. Pertanto, se è verosimile che i macrofagi sono esposte ad elevate concentrazioni di sPLA₂ secrete nelle vie aeree nel corso delle reazioni infiammatorie, è ipotizzabile che queste cellule possano rappresentare cellule bersaglio delle sPLA₂, soprattutto se esprimono il recettore tipo M.

In questa serie di esperienze abbiamo valutato l'effetto di diverse isoforme di sPLA₂ umane ricombinanti sulla produzione di citochine e chemochine dai macrofagi polmonari umani (HLM). Inoltre, abbiamo verificato la dipendenza degli effetti delle sPLA₂ dall'attività enzimatica ed abbiamo analizzato la presenza del recettore tipo M in queste cellule. Infine, abbiamo analizzato alcuni degli eventi di trasduzione del segnale attivati dalla interazione delle sPLA₂ con il recettore tipo M.

MATERIALI E METODI

Reagenti e Tamponi

I seguenti materiali sono stati acquistati: il lipopolisaccaride (LPS) da *Escherichia coli* sierotipo 026:B6, l'albumina sierica umana (HSA), l'albumina sierica bovina (BSA), la piperazina-N,N'-bis-2-acido etansulfonico (PIPES), il Percoll[®] (densità: 1,077), la L-glutamina, la soluzione antibiotico-antimicotica (10.000 UI/ml penicillina, 10 mg/ml streptomicina e 25 µg/ml amfotericina B) ed il Triton X-100 da Sigma (St. Louis, MO); il RPMI-1640, il bromofenacilbromide (BPB), il ditiotreitolo (DTT) ed il siero bovino fetale (FCS) da ICN (Costa Mesa, CA); gli anticorpi di coniglio anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-fosfo-p38 (Thr180/Tyr182), anti-fosfo-Akt (Thr308), anti-fosfo-Akt (Ser473), anti-fosfo-IκBα (Ser32), anti-Akt e anti-IκB e i composti PD98059 e LY294002 da Cell Signaling (Beverly, MA); gli anticorpi di coniglio anti-ERK2 (C-14) ed anti-p38 (C-20), l'anticorpo di capra anti-GAPDH (V-18), gli anticorpi secondari coniugati a perossidasi da Santa Cruz (Santa Cruz, CA); i composti SB203580, MG-132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal; Z-LLL-CHO), 6-amino-4(4-fenossifenilettilamino)chinazolina (chinazolina-11q, Q11q) da Calbiochem (La Jolla, CA); l'IFN-γ e l'IL-4 da PeproTech (London, UK). I *primers* per CXCL8/IL-8, TNF-α e β-actina sono stati disegnati con il software Beacon Designer 2 (Biorad, Hercules, CA) e sono stati prodotti mediante il servizio Custom Primers della Invitrogen (Milano, Italia). Tutti gli altri prodotti sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia).

Le sPLA₂ umane ricombinanti di gruppo IB (hGIB), gruppo IIA (hGIIA), gruppo V (hGV), gruppo X (hGX) e gruppo XIIA, l'anticorpo anti-recettore tipo M di topo e il composto Me-Indoxam sono stati donati dal Prof. Michael H. Gelb (Università di

Washington, Dipartimento di Chimica e Biochimica, Seattle, USA). Le sPLA₂ umane di gruppo III (hGIII), i mutanti H48Q della hGIB (hGIB-H48Q) e della hGIIA (hGIIA-H48Q) e l'anticorpo anti-recettore di tipo M di coniglio sono stati donati dal Prof. Gerard Lambeau (Istituto di Farmacologia Molecolare e Cellulare, Centro Nazionale di Ricerca Scientifica, Francia). Le sPLA₂ hGIB inattivate con BPB o DTT sono state preparate come descritto precedentemente [46, 55]. In breve, la sPLA₂ hGIB è stata incubata per 4 ore a 37°C con 1 mM di BPB oppure per 2 ore a 50°C con 10 mM di DTT prima dell'aggiunta alle colture cellulari.

Il tampone PIPES è composto di 25 mM piperazina-N,N'-bis-2-acido etansulfonico (PIPES), 110 mM NaCl e 5 mM KCl, pH 7,4. Il tampone PCG è composto da PIPES buffer contenente 1 mM CaCl₂ ed 1 g/L D-glucosio, pH 7,4. Il buffer di lisi (LB) per il Western Blot è composto di 20 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 1mM PMSF, 2 mM benzamidina, 10 µg/ml leupeptina, 10 mM NaF, 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 1% Nonidet P-40 e 5% glicerolo. Il tampone TBST è composto 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, e 0.1% Tween 20, pH 7.6. Il PBS buffer è composto da 136 mM NaCl, 373 mM KCl, 681 mM di KH₂PO₄, 123 mM Na₂HPO₄, pH 7,3.

Isolamento e purificazione dei Macrofagi Polmonari Umani (HLM)

I macrofagi polmonari umani (HLM) sono stati isolati dal parenchima polmonare di pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia toracica con una tecnica utilizzata nel nostro laboratorio da molti anni [47]. Il tessuto polmonare macroscopicamente sano è stato tagliato in piccoli frammenti in tampone PIPES. La sospensione cellulare ottenuta è stata sottoposta a filtrazione su strato di Nytex (con pori di 120 µm di diametro) mediante ripetuti lavaggi con PIPES buffer. Le cellule sono state separate mediante centrifugazione (2000 rpm, 22°C, 20 min) su gradienti discontinui di Percoll. La

sospensione arricchita di macrofagi (> 80%) è stata risospesa (10^6 cellule/ml) in RPMI contenente 5% di FCS, 2 mM di L-glutamina e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica ed incubate in piastre di polistirene a 37°C in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂. Dopo 12 ore il mezzo di coltura è stato rimosso ed le cellule flottanti sono state rimosse mediante lavaggio con RPMI. Con questa procedura più del 98% delle cellule aderenti sono macrofagi, come dimostrato dalla positività al test dell' α naftil-acetato esterasi [47]. In esperimenti che utilizzavano HLM non aderenti, le cellule sono state centrifugate ripetutamente su gradienti di Percoll fino ad ottenere una purezza >95% come dimostrato dalla doppia per CD/CD71/HLA DR valutata mediante citometria a flusso.

Incubazioni cellulari

I macrofagi aderenti sono stati incubati (37°C, 2-24 ore) con concentrazioni crescenti (0,1 - 10 μ g/ml) delle diverse sPLA₂. Tutte le preparazioni di sPLA₂ sono state ripetutamente testate per una possibile contaminazione da LPS mediante un test specifico (ICN, *Limulus Amebocyte Test*) e scartate se la concentrazione di LPS risultava superiore al limite di rilevazione del dosaggio (0,125 EU/ml). In esperimenti selezionati, le cellule sono state preincubate (37°C, 1 ora) con o senza INF- γ (1000 U/ml) e poi incubate (37°C, 24 ore) con concentrazioni ottimali di sPLA₂ (10 μ g/ml), LPS (10 μ g/ml) o IL-4 (50 ng/ml). In altri esperimenti, gli HLM sono stati incubati con hGIB inattivata con BPB o DTT oppure con i mutanti H48Q della hGIB (hGIB-H48Q) e della hGIIA (hGIIA-H48Q). In ulteriori esperimenti le PLA₂ sono state incubate (15 min, 37°C) con concentrazioni crescenti di Me-indoxam (0,01 - 10 μ M) prima della aggiunta alle colture di macrofagi. Infine, negli esperimenti con gli inibitori delle chinasi intracellulari o del fattore di trascrizione nucleare kappa B (NF κ B) gli HLM

sono stati preincubati (37°C, 1 ora) con concentrazioni scalari di PD98059, SB203580, LY294002, MG-132 o Q11q e poi stimulate (37°C, 6 ore) con hGX (10 µg/ml).

Al termine delle incubazioni, i sopranatanti sono stati recuperati, centrifugati due volte (1.000 x g, 4°C, 5 min.) e conservati a -80°C per la successiva determinazione di citochine (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12) e chemochine (CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL22/MDC, CXCL8/IL-8). Le cellule sono state lisate con Tryton X-100 0,1% per la successiva determinazione del contenuto totale di proteine con il metodo di Lowry [47]. La percentuale di cellule vitali è stata valutata al termine di ogni esperimento mediante la tecnica di esclusione del trypan blue [47]. In tutti gli esperimenti la vitalità cellulare è rimasta superiore al 95%.

Dosaggio ELISA per citochine e chemochine

La secrezione di citochine e chemochine nei sopranatanti delle colture di macrofagi è stata misurata usando kit ELISA per TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12 e CXCL8/IL-8 (Euroclone, Devon, UK) e per CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL2/MCP-12 (R&D System, Minneapolis, MN). Il range di linearità dei dosaggi ELISA era tra 20 e 800 pg/ml per il TNF- α , tra 6 e 200 pg/ml per l'IL-6 e l'IL-12, tra 12 e 400 pg/ml per l'IL-10, tra 15,5 e 1000 pg/ml per la CCL2/MCP-1 e la CCL4/MIP-1 β , tra 8 e 500 pg/ml per la CCL2/MCP-12 e tra 30 e 2000 pg/ml per la CXCL8/IL-8. I risultati sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine in ciascun campione.

Espressione di mRNA per TNF- α e CXCL8/IL-8

L'espressione degli mRNA per TNF- α e CXCL8/IL-8 è stata valutata mediante RT-PCR semiquantitativa e RT-PCR quantitativa (*real time*). Negli esperimenti di RT-PCR semiquantitativa i macrofagi (5×10^6 /2 ml) sono stati incubati (37°C, 3-12 ore)

con hGIB, hGIII e hGX (5 µg/ml). Al termine dell'incubazione l'RNA cellulare totale è stato estratto con la tecnica del RNazolB (Invitrogen, Milano). La trascrizione inversa è stata realizzata con 5 mM MgCl₂, primer oligod(t)₁₆, e trascrittasi inversa MuLV. La PCR è stata eseguita usando Taq polimerasi (1 - 2.5 U/reazione) alla temperatura di 60°C con primers specifici per TNF-α (*forward* 5'-AGGGCAGTCAGATCA-TCTTCTCG-3' e *reverse* 3'-TCTTGATGGCA GAGAGGAGG-5'), CXCL8/IL-8 (*forward* 5'-GCATCTGGCAACCCTACAA-3'e *reverse* 3'-CCTTCCACCCCAAATTTATC-5') (30 cicli). La normalizzazione dell'RNA è stata ottenuta titolando il gene costitutivamente espresso della β-actina (30 cicli). Tutti i prodotti della PCR sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio, visualizzati con bromuro di etidio e sviluppati grazie ad un sistema di acquisizioni di immagini (ChemidocXRS; Bio-Rad).

Negli esperimenti di RT-PCR quantitativa, i macrofagi (5 x 10⁶/2 ml) sono stati incubati a 37°C con o senza hGX (5 µg/ml) per tempi diversi (3-12 ore). Al termine dell'incubazione, l'RNA cellulare totale è stato isolato usando il sistema di SV96 (Promega, Milano) ed è stato trattato con DNasi I. La RT è stata eseguita come descritto in precedenza. La PCR quantitativa è stata eseguita con un ICycler (Bio-Rad) utilizzando PE-SYBR Green kits (Applied Biosystems) e i primers per TNF-α e CXCL8/IL-8 descritti in precedenza. Al termine dell'amplificazione, è stata costruita una curva di *melting* aumentando la temperatura fino a 95°C di 0,2°C/sec. La fluorescenza è stata misurata in continuo mentre la temperatura saliva lentamente per monitorare la dissociazione dei prodotti di PCR. In tal modo, ogni singolo prodotto PCR generava un segnale specifico e quindi un picco di *melting* specifico. I dati ottenuti sono stati analizzati con il *software* di analisi ICycler iQ (Bio-Rad), e l'espressione di TNF-α e CXCL8/IL-8 indotta dalla sPLA₂ è stata determinata come incremento percentuale

rispetto alle cellule non stimulate. Come in precedenza, i risultati sono stati normalizzati utilizzando il gene costitutivamente espresso della β -actina.

Espressione del recettore per sPLA₂ tipo M sugli HLM

I macrofagi polmonari umani sono stati processati immediatamente dopo la purificazione. La presenza del recettore tipo M è stata valutata utilizzando un triplice approccio sperimentale: 1) espressione del mRNA mediante RT-PCR; 2) espressione della proteina nei lisati cellulari mediante western blot; 3) espressione del recettore sulla superficie cellulare mediante analisi citofluorimetrica.

1) Analisi della espressione del mRNA mediante RT-PCR

L'RNA cellulare totale è stato estratto dalle cellule (5×10^6) con la tecnica del RNeasy. La RT è stata eseguita come descritto in precedenza. La PCR è stata eseguita usando la Taq polimerasi (1 - 2.5 U/reazione) alla temperatura di 60°C con primers specifici per il recettore tipo M disegnati *ad hoc* (*forward* 5'-AGAGATGTGAAACCCAAGA-3' e *reverse* 3'-TCAGAGTTCTTTCTCTTCC-5') (35 cicli). Tutti i prodotti PCR sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio, visualizzati con bromuro di etidio e sviluppati grazie al sistema di acquisizioni di immagini ChemiDoc XRS.

2) Analisi della presenza della proteina nei lisati cellulari mediante western blot

I macrofagi (3×10^6) sono stati lisati con LB. La componente proteica è stata separata dai nuclei mediante centrifugazione (15.000 rpm, 20 min, 4°C) e diluita nel tampone di elettroforesi (NOVEX; Invitrogen Life Technologies). Gli estratti proteici sono stati separati su gel Bis-Tris 4–12% (NuPAGE; NOVEX) insieme ad uno *standard* proteico biotinilato (Cell Signaling) e quindi trasferiti su membrane di nitrocellulosa (Bio-Rad). I recettori tipo M di coniglio e di topo sono stati usati come controllo

positivo per i due anticorpi. Dopo il bloccaggio in TBST contenente il 5% di latte, le membrane sono state lavate con il TBST e poi incubate (4°C, 18 ore) con un anticorpo diretto contro il recettore tipo M di coniglio oppure con un anticorpo diretto contro il recettore tipo M di topo. Le membrane sono state poi lavate e incubate (22°C, 1 ora) con gli anticorpi secondari coniugati a perossidasi. Gli anticorpi legati alle membrane sono stati visualizzati con un sistema di chemiluminescenza per western blot (Amersham Biosciences) e sviluppati grazie al sistema di acquisizioni di immagini ChemiDoc XRS.

Per l'immunoprecipitazione, le cellule (5×10^6) sono state lisate con 1 ml di LB e la componente proteica è stata separata dai nuclei mediante centrifugazione (15.000 rpm, 20 min, 4°C). Le proteine cellulari sono state incubate (4°C, 1 ora) con l'anticorpo diretto contro il recettore tipo M di coniglio coniugato a sfere di sefariosio mediante la proteina G dello stafilococco, e poi precipitate mediante centrifugazione (1000 rpm, 10 sec, 4°C). Le proteine immunoprecipitate sono state eluite mediante bollitura in presenza di 2,5% di 2 β -mercaptoetanolo (2 β -ME). Le proteine sono state sottoposte a elettroforesi e trasferimento come descritto in precedenza. Le membrane sono quindi state incubate con un anticorpo diretto contro il recettore tipo M di topo e quindi con un anticorpo secondario coniugato a perossidasi. Le bande immunoreattive sono state visualizzate come descritto in precedenza.

3) Analisi della espressione del recettore sulla superficie cellulare mediante analisi citofluorimetrica

Le cellule ($10^6/0,5$ ml) sono state risospese in PBS ed incubate (20 min, 4°C) con gli anticorpi diretti contro il recettore tipo M di coniglio o di topo in presenza del 20% di FCS. Le cellule sono state lavate con PBS ed incubate (20 min, 4°C) con anticorpi secondari coniugati a fluoresceina isotiocianato (FITC). Per ridurre l'autofluorescenza

spontanea tipica dei macrofagi polmonari, le cellule sono state incubate in una soluzione satura di cristal violetto come descritto precedentemente [94]. Le cellule sono state quindi lavate con PBS ed analizzate con un citofluorimetro (Necton Dickinson). Come controllo isotipico sono state usate cellule incubate con anticorpi primari irrilevanti oppure con siero pre-immunizzazione e processate secondo lo stesso protocollo.

Analisi della fosforilazione delle chinasi mediante western blot

Gli HLM sono stati risospesi in PCG. Le cellule (10^6 per campione) sono state incubate (37°C, 1-120 min.) con diverse sPLA₂ (hGIB, hGIIA, hGIII, hGV, hGX, hGXIIA (5 µg/ml). Al termine dell'incubazione le reazioni sono state bloccate aggiungendo PIPES freddo (4°C) e i campioni sono stati centrifugati a (15.000 rpm, 30 sec, 4°C). Le cellule sono state lisate con LB ed i lisati cellulari ottenuti sono stati incubati in ghiaccio per 20 min e poi centrifugati (15.000 rpm, 20 min, 4°C) per separare la componente proteica dai nuclei. Il sopranatante contenente le proteine è stato recuperato e diluito nel tampone per elettroforesi (LSB, Novex, Invitrogen, Milano, Italia) contenente il 2,5% di 2β-ME. Le proteine sono state separate su gel Bis-Tris al 10% (NuPAGE®, Novex) e trasferite su membrane di nitrocellulosa (Biorad, Hercules, CA). Dopo bloccaggio per 18 ore in TBST contenente il 4 % di BSA, le membrane sono state lavate con TBST e poi incubate (4°C, 18 ore) con gli anticorpi indicati (anti-fosfo ERK1/2, anti-fosfo p38, anti-fosfo Akt o anti-fosfo Ikb). Dopo i lavaggi con TBST, le membrane sono state incubate (22°C, 1 ora) con anticorpi secondari coniugati a perossidasi e le bande immunoreattive sono state visualizzate come descritto in precedenza.

Nonostante i campioni di partenza contenessero un numero di cellule uguale, gli anticorpi legati alle membrana sono stati “strippati” mediante incubazione delle

membrane in guanidina 7 M. Successivamente le membrane sono state incubate con anticorpi diretti contro le forme non fosforilate delle varie proteine (anti-ERK1/2, anti-p38, anti-Akt, anti-I κ b o anti-GAPDH) per verificare che la quantità di proteine in ciascun campione fosse sovrapponibile. Il calcolo densitometrico dell'intensità di segnale è stato eseguito con il *software* Quantity One 4.6.0 (Biorad) e l'indice di fosforilazione delle chinasi è stato calcolato come rapporto tra il segnale dei campioni trattati con le sPLA₂ e i campioni non stimolati (controlli). La normalizzazione è stata eseguita calcolando l'intensità di segnale delle forme non fosforilate delle diverse chinasi o in alcuni casi della proteina GAPDH.

Analisi Statistica

I risultati sono espressi come media \pm ES di un numero variabile da 5 a 8 esperimenti. Il valore di p è stato determinato con il test t di Student per campioni accoppiati [95].

RISULTATI

Effetto delle sPLA₂ sulla produzione di citochine e chemochine negli HLM

In un primo gruppo di esperimenti abbiamo valutato l'effetto di diverse sPLA₂ umane sulla produzione del TNF- α e della CXCL8/IL-8/IL-8, che rappresentano la principale citochina e chemochina prodotte dai macrofagi umani. Gli HLM sono stati incubati (6 ore, 37°C) con concentrazioni crescenti (0,1 – 10 μ g/ml) di hGIB, hGIIA, hGIII, hGV, hGX, e hGXIIA ricombinanti che sono state sintetizzate presso il laboratorio del dal Prof. Michael H. Gelb (Università di Washington, Dipartimento di Chimica e Biochimica, Seattle, USA) [63]. Le sPLA₂ hGIB, hGIIA, hGV e hGX inducono la secrezione di TNF- α ([Figura 1](#)) e CXCL8/IL-8 ([Figura 2](#)) in maniera concentrazione dipendente. L'effetto di queste sPLA₂ risulta significativo alla concentrazione di 1 μ g/ml e raggiunge il massimo a 10 μ g/ml. A parità di concentrazione utilizzata, le sPLA₂ hanno una potenza diversa nell'indurre la secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 dagli HLM. In particolare, la hGX risulta essere la sPLA₂ più efficace nell'attivare i macrofagi polmonari e l'ordine di potenza risultante è: hGX > hGV > hGIB \geq hGIIA. Viceversa, le sPLA₂ hGIII e hGXIIA non inducono la secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 anche se la concentrazione viene aumentata fino a 20 μ g/ml (dati non mostrati) o se l'incubazione viene prolungata per 24 ore (dati non mostrati). Questi risultati dimostrano che alcune sPLA₂ umane, ma non tutte, sono potenti stimoli per attivare la secrezione di citochine e chemochine dai macrofagi umani.

In una serie successiva di esperimenti abbiamo esaminato il profilo di citochine e chemochine prodotte dagli HLM stimolati con sPLA₂. La [Figura 3](#) mostra l'effetto della hGX sulla secrezione delle più importanti citochine prodotte dai macrofagi polmonari umani. La hGX induce la secrezione concentrazione-dipendente di IL-6 e IL-

10, ma non di IL-12. Quest'ultima citochina non viene secreta dai macrofagi, anche quando gli HLM sono stati preincubati (37°C, 1 ora) con INF- γ (1000 U/ml), una citochina che è in grado di esercitare un potente effetto di priming sulla produzione di IL-12 [55]. Infatti, gli HLM preincubati con INF- γ e poi stimolati con LPS rilasciano quantità significative di IL-12 (LPS: 122 ± 16 pg/mg di proteine; cellule di controllo: 22 ± 3 pg/mg di proteine; $p < 0,01$). L'incubazione degli HLM con hGX determina anche la produzione di diverse chemochine ([Figura 4](#)). In particolare, la hGX induce la secrezione concentrazione-dipendente di grosse quantità di CCL2/MCP-1 e CCL4/MIP-1 β . Viceversa, la hGX non induce la secrezione di CCL22/MDC, sebbene gli HLM siano in grado di produrre tale chemochina quando stimolati con IL-4 (IL-4: $7,73 \pm 1,79$ ng/mg di proteine; cellule di controllo: $2,22 \pm 0,54$ ng/mg di proteine; $p < 0,01$) [96]. I risultati di questi esperimenti indicano che le sPLA₂ sono in grado di attivare la produzione di un ampio spettro di citochine (TNF- α > IL-6 > IL-10) e chemochine (CXCL8/IL-8 >> CCL4/MIP-1 β > CCL2/MCP-1) negli HLM.

La secrezione di citochine e chemochine è un evento che generalmente richiede l'attivazione della trascrizione genica [97]. Per verificare se le sPLA₂ siano in grado di attivare la trascrizione dell'mRNA delle citochine e chemochine nei macrofagi umani, abbiamo esaminato l'espressione degli mRNA del TNF- α e della CXCL8/IL-8 negli HLM stimolati con sPLA₂, mediante RT-PCR eseguita sia con metodica semiquantitativa che quantitativa. La [Figura 5A](#) mostra i prodotti di amplificazione della β -actina (*prima riga*), CXCL8/IL-8 (*seconda riga*) e TNF- α (*terza riga*) di un tipico esperimento in cui i macrofagi sono stati incubati con hGIB e hGX. La hGIII, che non attiva la secrezione di citochine e chemochine, è stata utilizzata come controllo negativo. Sia la hGIB che la hGX inducono un aumento dell'espressione di mRNA di

CXCL8/IL-8 e TNF- α . Viceversa, la hGIII, non influenza l'espressione di mRNA né di CXCL8/IL-8 né di TNF- α .

Per un accurata quantificazione dell'effetto di attivazione delle sPLA₂ sulla trascrizione di mRNA, parallelamente sono stati eseguiti esperimenti di RT-PCR *real-time* in cui i macrofagi venivano stimolati con la hGX (5 μ g/ml) per tempi diversi (3, 6 o 12 ore). La hGX aumenta la trascrizione genica di TNF- α e CXCL8/IL-8 da un minimo 3 ad un massimo di 6 volte ([Figura 5B](#)). Le cinetiche di attivazione delle due molecole risultano leggermente differenti, poiché la trascrizione massima di TNF- α si osserva dopo 3 ore di stimolazione con sPLA₂, mentre l'effetto sull'mRNA della CXCL8/IL-8 raggiunge il picco dopo 6 ore. I risultati di questi esperimenti dimostrano che la produzione di citochine e chemochine indotte dalla sPLA₂ è associata all'attivazione della loro trascrizione genica.

Ruolo dell'attività enzimatica delle sPLA₂ nella produzione di citochine e chemochine negli HLM

È noto che le sPLA₂ possono indurre effetti biologici sia con meccanismi dipendenti dall'attività enzimatica sia in maniera indipendente da quest'ultima [43, 62]. Per verificare se la capacità delle sPLA₂ di indurre la produzione di citochine e chemochine dai macrofagi polmonari fosse correlata alla attività enzimatica, gli HLM sono stati incubati con sPLA₂ inattivate con due diversi approcci sperimentali. Nel primo le cellule sono state incubate con una sPLA₂ (hGIB) la cui attività enzimatica era stata inattivata in maniera irreversibile con due diversi trattamenti farmacologici. In particolare, la hGIB è stata inattivata mediante trattamento con BPB, un inibitore specifico del sito catalitico delle sPLA₂ [16], oppure con DTT, un agente riducente che altera la struttura secondaria della sPLA₂ rompendo i ponti disolfuro [98]. Esperimenti

di controllo hanno confermato che le sPLA₂ inattivate con BPB e DTT possiedono entrambe meno del 2% dell'attività enzimatica della molecola sPLA₂ attiva. La [Figura 6](#) mostra che gli HLM stimolati con la sPLA₂ inattivata con BPB secernono quantità di TNF- α e CXCL8/IL-8 comparabili a quelle indotte dalla sPLA₂ attiva. Viceversa, il trattamento con DTT abolisce completamente la capacità della sPLA₂ di indurre la secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8. È importante sottolineare, che in queste stesse condizioni il DTT non altera la secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 indotta dall'LPS (dati non mostrati), ad indicare che il DTT non influenza aspecificamente la capacità degli HLM di produrre citochine e chemochine. Questi risultati suggeriscono che l'attività enzimatica non è primariamente responsabile della secrezione di citochine e chemochine indotta dalle sPLA₂ ed indicano che l'alterazione della struttura secondaria di queste molecole abolisce la capacità delle sPLA₂ di interagire con i macrofagi polmonari.

Per confermare queste ipotesi, i macrofagi sono stati incubati (37°C, 6 ore) con una variante mutata delle isoforme hGIB e hGIIA in cui un residuo di istidina in posizione 48 (all'interno del sito catalitico) è stato sostituito da un residuo di glutamina mediante mutagenesi sito-diretta (mutazione H48Q) [65, 99]. Tali mutanti, denominati hGIB-H48Q e hGIIA-H48Q sono stati sintetizzati nel laboratorio del Prof. Gerard Lambeau (Istituto di Farmacologia Molecolare e Cellulare, Centro Nazionale di Ricerca Scientifica, Francia). A questo proposito, è importante sottolineare che la mutazione H48Q delle sPLA₂ provoca la perdita quasi totale dell'attività enzimatica (~ 0,01% dell'attività enzimatica residua), ma determina solo minime variazioni nella struttura tridimensionale e nella stabilità della molecola, e soprattutto non modifica le capacità di interazione delle sPLA₂ con loro recettori [64, 65, 99-101]. La [Figura 7](#) mostra che i mutanti H48Q inducono la secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 in maniera del tutto

analoga a quella determinata dalla hGIB e dalla hGIIA *wild type*. Questi risultati dimostrano che l'abolizione dell'attività enzimatica delle sPLA₂ non altera la loro capacità di attivare la produzione di citochine e chemochine nei macrofagi e quindi che l'attività catalitica, verosimilmente, non è coinvolta in questo effetto indotto dalle sPLA₂.

Espressione del recettore tipo M sugli HLM

È stato dimostrato che nel sistema murino, alcune isoforme di sPLA₂ fungono da ligandi ad alta affinità per il recettore tipo M [85, 86]. In particolare, le isoforme capaci di legare il recettore tipo M sono la GIB, la GIIA e la GX. Viceversa, la GIII non lega il recettore tipo M sia esso di roditore, di coniglio o di uomo [85]. Sebbene non è stato ancora dimostrato che il sistema murino possa essere applicato anche nell'uomo, la differente capacità delle isoforme umane di sPLA₂ di attivare la secrezione di citochine e chemochine nei macrofagi umani suggerisce che il recettore tipo M possa essere coinvolto in questo effetto indotto dalla sPLA₂. L'espressione del recettore tipo M è stata descritta in diversi tessuti umani [75], il suo mRNA è stato identificato nei monociti [48] e la presenza della proteina è stata riportata nei neutrofili [45]. Tuttavia, l'espressione di questo recettore nei macrofagi tissutali non è stata studiata e una dimostrazione completa della presenza di questo recettore su cellule del sistema immunitario non è stata ancora fornita. Pertanto, nella successiva serie di esperimenti abbiamo valutato la presenza del recettore tipo M negli HLM usando un triplice approccio sperimentale.

Inizialmente abbiamo valutato l'espressione dell'mRNA specifico per il recettore tipo M mediante RT-PCR. I risultati di questi esperimenti dimostrano che due diverse preparazioni di macrofagi polmonari esprimono livelli significativi di mRNA per il

recettore tipo M ([Figura 8A](#)). Per confermare che la sequenza di questo mRNA fosse identica a quella del recettore tipo M originariamente clonato nel rene e nella placenta umana, l'mRNA espresso nei macrofagi polmonari è stato sequenziato presso il laboratorio del Prof. Gerard Lambeau ed è stata dimostrata una corrispondenza del 99% tra le due sequenze a dimostrazione che il trascritto amplificato nei macrofagi polmonari umani corrisponde al trascritto che codifica per il recettore tipo M umano.

Successivamente, per determinare se l'mRNA veniva tradotto in proteina, gli estratti proteici sono stati purificati da lisati cellulari di HLM e la presenza della proteina del recettore tipo M è stata esaminata mediante western blot. Non avendo a disposizione un anticorpo specifico diretto contro il recettore tipo M umano, abbiamo utilizzato due anticorpi diretti contro il recettore di tipo M di coniglio e di topo. La [Figura 8B](#) mostra che, in due diverse preparazioni di macrofagi polmonari, entrambi gli anticorpi riconoscono una banda immunoreattiva che migra in corrispondenza del recettore tipo M purificato dal coniglio (primo gel) e dal topo (secondo gel), che sono stati utilizzati come standard. La banda immunoreattiva visualizzata ha un peso molecolare apparente (M_r) di ~ 180 kDa, che corrisponde al M_r della forma di membrana del recettore tipo M umano. Questa banda non viene riconosciuta da anticorpi irrilevanti utilizzati come controlli isotipici (dati non mostrati). Per verificare ulteriormente la specificità della immunoreattività degli anticorpi, il recettore tipo M è stato immunoprecipitato nei lisati di macrofagi usando l'anticorpo diretto contro il recettore tipo M di coniglio ed è stato visualizzato mediante western blot utilizzando l'anticorpo diretto contro il recettore tipo M di topo ([Figura 8C](#)). Questi risultati dimostrano che la proteina del recettore tipo M è presente nei macrofagi polmonari umani.

Infine, per confermare che il recettore tipo M viene espresso sulla superficie degli HLM, è stata condotta un'analisi citofluorimetrica mediante una tecnica di immunofluorescenza indiretta che utilizzava gli stessi anticorpi diretti contro il recettore tipo M usati per il western blot. In particolare, i macrofagi sono stati incubati contemporaneamente con l'anticorpo anti-recettore tipo M di coniglio, con IgG irrilevanti (controllo isotipico), con il siero immune anti-recettore tipo M di topo o con il siero pre-immunizzazione. In entrambi i casi le cellule sono state successivamente marcate con anticorpi secondari coniugati a FITC. I risultati di questi esperimenti sono mostrati in [Figura 9](#) e dimostrano come il recettore di tipo M sia presente sui macrofagi e venga riconosciuto da entrambi gli anticorpi, ma non dal controllo isotipico e dal siero pre-immunizzazione. Questi esperimenti dimostrano per la prima volta che i macrofagi polmonari umani sintetizzano l'mRNA per il recettore tipo M e lo traducono in una proteina che viene espressa sulla superficie cellulare.

Effetto di Me-indoxam sulla produzione di citochine e chemochine indotta dalle sPLA₂ negli HLM

Studi recenti hanno dimostrato che due derivati dell'indolo denominati Indoxam e Me-indoxam sono in grado di bloccare simultaneamente l'attività enzimatica delle sPLA₂ [63, 102] e l'interazione tra le sPLA₂ ed il recettore di tipo M [86, 103]. Ad oggi, queste molecole inizialmente sintetizzate come inibitori sito-diretti dell'attività enzimatica delle sPLA₂ sono le uniche molecole che possono prevenire il legame della sPLA₂ con il suo recettore. Studi recenti indicano che la struttura a raggi X del complesso hGX/Me-indoxam mostra una porzione dell'inibitore legato nel sito catalitico della sPLA₂ che viene esposta sulla superficie dell'enzima [104]. Poiché alcuni residui aminoacidici situati nelle immediate vicinanze del sito catalitico delle

sPLA₂, sono coinvolti nell'interazione con il recettore tipo M [82] è verosimile che il legame di questi inibitori al sito catalitico delle sPLA₂ interferisca con il legame della sPLA₂ al recettore tipo M creando un ingombro sterico. Pertanto, nel gruppo successivo di esperimenti abbiamo valutato l'effetto di Me-indoxam sulla secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 indotta dalla hGX negli HLM. Dati preliminari indicano che Me-indoxam (0,01 – 10 μ M) non altera la secrezione basale di TNF- α e di CXCL8/IL-8 dai HLM né modifica la secrezione di TNF- α e di CXCL8/IL-8 indotta da LPS (dati non mostrati). Viceversa, la preincubazione (15 min, 37°C) della hGX (1 μ g/ml) con concentrazioni crescenti di Me-indoxam, inibisce in maniera dose dipendente la secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 ([Figura 10](#)). I valori di IC₅₀ di Me-indoxam sono 253 \pm 72 nM sulla secrezione di TNF- α e 320 \pm 87 nM sulla secrezione di CXCL8/IL-8. Questi valori sono compatibili con quelli descritti per l'inibizione del legame della hGX al recettore tipo M negli esperimenti di binding [104] e per l'inibizione della attività catalitica nel saggio in vitro [63]. Questi risultati indicano che Me-indoxam blocca la produzione di citochine indotta dalle sPLA₂, presumibilmente, legandosi alla sPLA₂.

Me-indoxam blocca sia il legame delle sPLA₂ al recettore tipo M che l'attività catalitica di tutte le sPLA₂ in grado di interagire con questo recettore [63]. Per verificare se l'effetto di inibizione di Me-indoxam fosse dovuto al blocco del legame sPLA₂/recettore tipo M, abbiamo valutato se questo composto fosse in grado di bloccare la produzione di citochine e chemochine indotta dai mutanti H48Q della hGIB (hGIB-H48Q) e della hGIIA (hGIIA-H48Q). Come accennato in precedenza, questi mutanti perdono completamente l'attività enzimatica, ma conservano intatta la capacità di legarsi al recettore tipo M [64, 65, 99-101]. In questi esperimenti la hGIB *wild type* (hGIB WT), la hGIIA *wild type* (hGIIA WT), la hGIB-H48Q e la hGIIA-H48Q (1 μ g/ml) sono state preincubate (15 min, 37°C) con una concentrazione ottimale (10 μ M)

di Me-indoxam e poi utilizzate per la stimolazione dei macrofagi. Me-indoxam blocca completamente la secrezione di TNF- α indotta sia dalle sPLA₂ native che dai mutanti cataliticamente inattivi ([Figura 11](#)). Risultati analoghi sono stati ottenuti sulla produzione di CXCL8/IL-8 (dati non mostrati). Questi risultati indicano che Me-indoxam inibisca la produzione di citochine e di chemochine indotta dalle sPLA₂ interferendo con il legame della sPLA₂ al recettore tipo M.

Ruolo di p38 ed ERK1/2 nella produzione di citochine e chemochine indotta dalle sPLA₂ negli HLM

È stato riportato che le sPLA₂ inducono l'attivazione di p38 e ERK1/2 in alcuni modelli sperimentali murini [45, 46, 57, 59, 105]. Entrambe queste chinasi appartengono alla famiglia delle MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) che, nelle cellule immunitarie, partecipano in numerose cascate intracellulari che trasducono il segnale dai recettori di membrana al nucleo per attivare la trascrizione genica [106]. Ad esempio, sia p38 che ERK1/2 sono coinvolte nella produzione di IL-6 e TNF- α indotta da LPS nei macrofagi alveolari umani [107].

In una serie di esperimenti volti a chiarire i meccanismi intracellulari attraverso cui le sPLA₂ promuovono la produzione di citochine e chemochine nei macrofagi, abbiamo esaminato se le sPLA₂ fossero in grado di attivare p38 e ERK1/2. Gli HLM sono stati incubati con hGX (5 μ g/ml) per tempi variabili (1-120 min.). Al termine dell'incubazione l'attivazione delle MAPK è stata valutata analizzando la fosforilazione di p38 e ERK1/2 usando anticorpi specifici diretti contro le forme fosforilate di queste chinasi. La [Figura 12A](#) mostra che la hGX induce la fosforilazione sia di p38 che di ERK1/2 in maniera tempo-dipendente e secondo una cinetica ritardata. Infatti, l'analisi densitometrica della intensità dei segnali ottenuta analizzando quattro esperimenti, ha

rivelato che l'effetto della sPLA₂ sulle MAPK è evidente solo dopo 5-15 minuti di incubazione ed aumenta in maniera progressiva fino a raggiungere un picco intorno ai 60-90 minuti, persistendo ancora dopo 120 minuti ([Figura 12B](#)). In esperimenti successivi, abbiamo valutato se la differente capacità delle varie sPLA₂ di indurre la secrezione di citochine e chemochine ([Figure 1 e 2](#)) fosse correlata ad un differente grado di attivazione delle MAPK. La [Figura 13](#) mostra i risultati di un esperimento rappresentativo in cui i macrofagi sono stati stimolati con le diverse sPLA₂ per un tempo ottimale. I risultati indicano che tutte le sPLA₂ in grado di indurre la secrezione di citochine e chemochine (hGIB, hGIIA, hGV e hGX) inducono anche la fosforilazione di p38 ed ERK1/2. Inoltre, esiste una relazione tra la potenza dell'effetto sulla secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 e la intensità di attivazione delle MAPK indotta dalle varie sPLA₂. Infatti, la hGV e la hGX che sono le due isoforme più potenti nell'indurre la secrezione di citochine e chemochine, sono anche quelle che determinano una maggiore intensità di fosforilazione di p38 ed ERK1/2. Viceversa, la hGIII e la hGXIIA che non ha effetto sulla secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8, non sono in grado di indurre neanche l'attivazione delle MAPK. Questi risultati indicano l'esistenza di una correlazione tra questi due effetti indotti dalle sPLA₂.

Per verificare che l'attivazione delle MAPK fosse necessaria per la produzione di citochine e chemochine, nella successiva serie di esperimenti abbiamo valutato l'effetto di inibitori selettivi di p38 (SB203580) [108, 109] ed ERK1/2 (PD98059) [109, 110] sulla produzione di TNF- α e CXCL8/IL-8 indotta dalla hGX negli HLM. Esperimenti preliminari hanno rivelato che l'inibizione di p38 da parte di SB203580 è completa con una concentrazione di 30 μ M, mentre ERK1/2 è bloccato con 50 μ M PD98059 (dati non mostrati). I macrofagi polmonari sono stati preincubati (37°C, 1 ora) con concentrazioni crescenti di SB203580 (3 - 30 μ M), PD98059 (10 - 50 μ M) e con una combinazione

delle concentrazioni ottimali dei due inibitori (SB203580: 30 μ M + PD98059: 50 μ M) prima della stimolazione con la hGX (10 μ g/ml). Sia SB203580 che PD98059 determinano una riduzione concentrazione-dipendente della secrezione di TNF- α ([Figura 14](#), pannello superiore) e CXCL8/IL-8 ([Figura 14](#), pannello inferiore) indotta dalla hGX. L'effetto inibitorio dei due composti utilizzati da soli è incompleto con una riduzione della secrezione del TNF- α (SB203580 30 μ M: 11,5% della risposta massima; PD98059 50 μ M: 17,2%) più evidente rispetto a quella della secrezione di CXCL8/IL-8 (SB203580 30 μ M: 19,1% della risposta massima; PD98059 50 μ M: 37,3%). Viceversa, l'incubazione dei macrofagi con entrambi gli inibitori blocca completamente la secrezione di citochine e chemochine indotta dalla sPLA₂. Questi risultati dimostrano che le sPLA₂ generano un segnale intracellulare che induce l'attivazione di p38 e ERK1/2 che a loro volta sono coinvolte nella produzione di TNF- α e CXCL8/IL-8 nei macrofagi polmonari umani. È importante sottolineare che per sopprimere completamente la produzione di citochine e chemochine è necessaria l'inibizione simultanea di entrambe le chinasi, ad indicare che le due MAPK cooperano per attivare la produzione ottimale di queste molecole.

Ruolo di PI3K nella produzione di citochine e chemochine indotta dalle sPLA₂ negli HLM

È stato riportato che la fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K) è coinvolta nella produzione di TNF- α ed IL-6 indotta da LPS e dagli esteri del forbolo (PMA) nei macrofagi murini RAW 264.7 [111]. Questa chinasi rappresenta un importante sistema di collegamento tra molti dei recettori presenti sulla superficie dei macrofagi e i sistemi intracellulari delle MAPK e dei fattori di trascrizione nucleare [112]. Nelle cellule di mammiferi, PI3K coopera con un'altra proteina denominata proteina chinasi B (PKB),

nota anche come Akt, che è una Ser/Thr chinasi la cui attivazione è strettamente dipendente da PI3K e la cui fosforilazione viene comunemente utilizzata come marcatore di attività di PI3K [113]. Pertanto, per verificare se il sistema PI3K/Akt avesse un ruolo nell'attivazione dei macrofagi umani indotta dalle sPLA₂, abbiamo analizzato valutato la cinetica di fosforilazione di Akt negli HLM stimolati con hGX. Poiché, Akt presenta due diversi siti di fosforilazione (Thr308 e Ser473), gli esperimenti di western blot sono stati eseguiti utilizzando due diversi anticorpi, uno diretto contro la forma di Akt quando esso è fosforilato in posizione Thr308 e l'altro diretto contro Akt fosforilato in posizione Ser473. La [Figura 15A](#) mostra un esperimento rappresentativo in cui la hGX (5µg/ml) induce la fosforilazione rapida di Akt sia in posizione Thr308 (primo gel) che in posizione Ser473 (secondo gel). Poiché l'anticorpo diretto contro Akt fosforilato in posizione Ser473 risulta più sensibile, l'analisi densitometrica dei tre esperimenti è stata eseguita sui western blot che utilizzavano questo anticorpo. La [Figura 15B](#) mostra che l'attivazione di Akt è un evento rapido, evidente già dopo 1 minuto di stimolazione, con un picco a 5 minuti e ritorno ai valori basali entro i 30-60 minuti. Questi risultati indicano che la sPLA₂ induce una attivazione rapida del sistema PI3K/Akt.

Per valutare il ruolo di PI3K nella produzione di citochine e chemochine indotta da sPLA₂, gli HLM sono stati preincubati (37°C, 1 ora) con concentrazioni crescenti (3 - 30 µM) di un inibitore specifico di PI3K (LY294002) [109, 114] e quindi sono stati stimolati con hGX (10 µg/ml). LY294002 inibisce in maniera concentrazione dipendente la secrezione sia di TNF-α che di CXCL8/IL-8 indotta dalla sPLA₂ ([Figura 16](#)). Tuttavia è importante rilevare che LY294002 inibisce in maniera quasi completa la secrezione di TNF-α (9,9% della risposta massima) mentre determina solo una riduzione parziale della secrezione di CXCL8/IL-8 (49,2% della risposta massima).

Questi risultati indicano che PI3K partecipa alla produzione di TNF- α e CXCL8/IL-8 indotta dalla sPLA₂ nei macrofagi polmonari.

Ruolo di NF- κ B nella produzione di citochine e chemochine indotta dalle sPLA₂ negli HLM

Il fattore di trascrizione nucleare denominato NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) regola la trascrizione di numerosi geni che codificano per citochine e chemochine [115]. NF- κ B è una proteina dimerica localizzata nel citoplasma e, nelle cellule quiescenti, forma dei complessi proteici con un inibitore specifico denominato I κ B. In seguito ad attivazione cellulare, I κ B viene fosforilato da una chinasi specifica denominata IKK, e dopo essersi staccato da NF- κ B, viene degradato nei proteosomi [116]. Questi eventi consentono a NF- κ B di traslocare nel compartimento nucleare e di legarsi a specifiche sequenze di DNA esercitando la funzione di transattivazione genica.

In questo gruppo di esperimenti abbiamo verificato l'ipotesi che la sPLA₂ potesse indurre l'attivazione di NF- κ B valutando la cinetica di fosforilazione e degradazione di I κ B. La [Figura 17A](#) mostra che la hGX (5 μ g/ml) induce sia la fosforilazione che la degradazione di I κ B negli HLM. La fosforilazione di I κ B precede la sua degradazione dal momento che fosfo-I κ B è evidente dopo 1-5 minuti e raggiunge un picco a 30 minuti, mentre il segnale I κ B comincia a ridursi dopo circa 30 minuti di incubazione con sPLA₂ ed è minimo dopo 120 minuti ($39,2 \pm 14,6\%$ del segnale iniziale) ([Figura 17B](#)).

Questi risultati sono compatibili con un'attivazione di NF- κ B indotta dalla sPLA₂ e supportano l'ipotesi di un suo coinvolgimento nella produzione di citochine e chemochine. Questa possibilità è stata verificata valutando l'effetto di due inibitori di

NF- κ B sulla secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 indotta dalla hGX. In questi esperimenti i HLM sono stati preincubati (37°C, 1 ora) con un inibitore dei proteosomi denominato MG-132 (0,3 - 30 μ M), il quale previene la degradazione di I κ B [117], e con un derivato della chinazolina denominato Q11q (0,1 - 10 μ M), che blocca l'attivazione trascrizionale di NF- κ B [118]. Sia la secrezione di TNF- α ([Figura 18, pannello superiore](#)) che di CXCL8/IL-8 ([Figura 18, pannello inferiore](#)), indotta dalla hGX, sono state inibite in maniera completa dai due composti con valori di IC₅₀ (MG-132: 1,80 \pm 0,48 μ M per TNF- α e 1,71 \pm 0,29 μ M per CXCL8/IL-8; Q11q: 0,40 \pm 0,10 μ M per TNF- α e 0,63 \pm 0,16 μ M per CXCL8/IL-8) sovrapponibili a quelli riportati per l'inibizione dell'attività di NF- κ B [117-119]. Inoltre, in questi stessi esperimenti, i due inibitori bloccano completamente anche la secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 indotta dall'LPS, utilizzato come controllo positivo (dati non mostrati). Questi risultati indicano che l'attivazione di NF- κ B è necessaria per la produzione di citochine e chemochine indotta dalle sPLA₂ negli HLM.

Possibili collegamenti trasduzionali negli HLM attivati dalle sPLA₂

Per avere ulteriori informazioni sui possibili collegamenti tra i vari sistemi di trasduzione attivati dalle sPLA₂ nei macrofagi umani, nell'ultimo gruppo di esperimenti gli HLM sono stati preincubati (37°C, 1 ora) con concentrazioni ottimali degli inibitori di p38 (SB203580), di ERK1/2 (PD98059) e di PI3K (LY294002) e quindi stimolati con hGX. Al termine dell'incubazione sono state analizzate la fosforilazione di p38 ed ERK1/2 e la degradazione di I κ B con il western blot. La [Figura 19](#) mostra i risultati di un esperimento rappresentativo in cui l'inibitore di PI3K, ma non gli inibitori di p38 ed ERK1/2, è in grado di bloccare la degradazione di I κ B (primo gel). LY294002 è anche in grado di prevenire la fosforilazione di ERK1/2 indotta dalla sPLA₂ in maniera

analoga a PD98059. Viceversa, nessuno degli inibitori utilizzati è in grado di prevenire la fosforilazione di p38 indotta dalla hGX (dati non mostrati). Sebbene questi dati necessitino di una ulteriore conferma, essi indicano che: 1) PI3K è coinvolta nella attivazione di ERK1/2 e di NF- κ B, ma non di p38; e 2) che p38 ed ERK1/2 non sono coinvolti nella attivazione di NF- κ B.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio dimostrano per la prima volta che le sPLA₂ umane di gruppo IB, IIA, V e X inducono ($\text{hGX} > \text{hGV} > \text{hGIB} \geq \text{hGIIA}$) la produzione di TNF- α e CXCL8/IL-8 dai macrofagi polmonari umani attivando la loro trascrizione genica. In particolare, la hGX che è l'isoforma umana più efficace sugli HLM, induce la produzione di numerose citochine (TNF- α , IL-6 e IL-10) e chemochine (CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β e CXCL8/IL-8). L'attivazione dei macrofagi polmonari indotta dalle sPLA₂ non è correlato alla attività catalitica di queste molecole quanto piuttosto alla interazione con il recettore tipo M espresso dai macrofagi e presente sulla membrana di queste cellule. Infatti, l'interazione delle sPLA₂ con questo recettore genera un segnale intracellulare che attraverso cascate di trasduzione cui partecipano il sistema PI3K/Akt, le MAPK p38 ed ERK1/2 ed il fattore nucleare NF- κ B, determina un aumento della espressione genica di alcune importanti citochine e chemochine come il TNF- α e la CXCL8/IL-8.

Lo spettro di molecole indotte dalle sPLA₂ negli HLM comprende citochine proinfiammatorie (TNF- α e IL-6) ed immunoregatorie (IL-10), oltre che chemochine di tipo CC (CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β) e CXC (CXCL8/IL-8). Questo profilo di citochine e chemochine indotto nei macrofagi polmonari indica che le sPLA₂ possono avere un ruolo importante nell'induzione e nel mantenimento dell'infiammazione a livello polmonare oltre che nella modulazione delle risposte immunitarie locali e nel reclutamento di cellule infiammatorie. In particolare, le elevate quantità di TNF- α , CXCL8/IL-8 e CCL4/MIP-1 β secrete dai macrofagi stimolati con le sPLA₂ suggeriscono che questi mediatori possano amplificare notevolmente le reazioni

infiammatorie a livello polmonare e determinare il reclutamento preferenziale di neutrofili e monociti nei siti dell'infiammazione. Queste osservazioni ottenute *in vitro* consentono di comprendere i risultati di precedenti esperimenti ottenuti *in vivo* che dimostrano che la somministrazione di sPLA₂ per via intradermica [39], inalatoria [41] od intraarticolare [38] induce un'intensa reazione infiammatoria caratterizzata da una marcata infiltrazione di neutrofili e di monociti.

È interessante notare che l'effetto delle sPLA₂ sulla sintesi di citochine e chemochine appare relativamente selettivo. Infatti, non tutte le citochine e chemochine potenzialmente prodotte dai macrofagi sono indotte dalle sPLA₂. Ad esempio, la hGX non influenza la produzione di IL-12 e di CCL22/MDC che sono, invece, indotte rispettivamente da LPS e IL-4. Un ulteriore livello di selettività è dimostrato dall'osservazione che non tutte le sPLA₂ sono efficaci nell'indurre la produzione di citochine e chemochine. Infatti, i risultati delle esperienze condotte con i macrofagi dimostrano che questa risposta è indotta dalle sPLA₂ hGIB, hGIIA, hGV e hGX, ma non da hGIII e hGXIIA. Dal momento che queste sPLA₂ possiedono una attività enzimatica comparabile [63], questa osservazione suggerisce che l'idrolisi dei fosfolipidi di membrana e la liberazione di AA non sia il meccanismo principale responsabile dell'induzione della produzione di citochine e chemochine. Altri risultati del nostro studio confermano questa ipotesi. Infatti, due diversi approcci sperimentali indicano che sPLA₂ private dell'attività catalitica (dal trattamento con BPB o da mutazioni del sito catalitico) inducono la produzione di TNF- α e CXCL8/IL-8 dagli HLM con efficacia sovrapponibile a quella delle forme native enzimaticamente attive. D'altro canto se l'attività enzimatica non è coinvolta, i nostri dati indicano che la struttura secondaria e terziaria della sPLA₂ è essenziale per l'attivazione dei macrofagi dal momento che la preincubazione della sPLA₂ con il DTT, un composto che riduce i

ponti disolfuro, abolisce completamente la capacità delle sPLA₂ di indurre la secrezione di citochine/chemochine. Nel loro insieme questi risultati escludono la possibilità che l'attività idrolitica sia il meccanismo principale con cui le sPLA₂ inducono la produzione di citochine e chemochine nei macrofagi polmonari e supportano l'ipotesi che le sPLA₂ regolino alcune funzioni cellulari mediante l'interazione con molecole di membrana quali, ad esempio, i recettori tipo M o tipo N.

Nel nostro studio abbiamo dimostrato per la prima volta che macrofagi umani esprimono il recettore tipo M per le sPLA₂ e che un inibitore dell'interazione sPLA₂/recettore tipo M (Me-indoxam) blocca la produzione di TNF- α e CXCL8/IL-8 indotta dalle sPLA₂. Infatti, gli HLM esprimono l'mRNA per il recettore tipo M che viene tradotto in una proteina con un *Mr* corrispondente a quello del recettore tipo M di membrana clonato nell'uomo. Questa proteina è espressa sulla superficie dei macrofagi ed è verosimilmente in grado di interagire con specifiche sPLA₂ come la hGX per indurre la produzione di citochine e chemochine. Quest'ultima ipotesi è sostenuta dai risultati ottenuti negli esperimenti con Me-indoxam che è l'unico agente farmacologico finora disponibile in grado di bloccare il legame tra le sPLA₂ ed il recettore tipo M [86, 103, 104]. Abbiamo dimostrato che Me-indoxam blocca la produzione di citochine indotta sia dalle isoforme native, enzimaticamente attive, che dai mutanti cataliticamente inattivi della hGIB (hGIB-H48Q) e della hGIIA (hGIIA-H48Q). Poiché le molecole *wild type* ed i mutanti H48Q hanno la stessa capacità di interagire con il recettore di tipo M [64] l'effetto inibitorio di Me-indoxam è verosimilmente dovuto al blocco del legame della sPLA₂ al recettore tipo M. Questo ipotesi è ulteriormente sostenuta dalla osservazione che Me-indoxam non interferisce con la secrezione basale di TNF- α e di CXCL8/IL-8 dai macrofagi polmonari e non funge da inibitore aspecifico della produzione di citochine e chemochine in queste cellule dal momento che non

blocca l'effetto dell'LPS. Nell'insieme queste osservazioni indicano che le sPLA₂ attivano i macrofagi attraverso un meccanismo mediato dall'interazione con il recettore tipo M e che quindi funzionano da mediatori extracellulari oltre che da enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico.

Lo scenario della attivazione recettoriale dei macrofagi polmonari da parte delle sPLA₂ è sostenuta anche dai risultati sulla trasduzione del segnale intracellulare generato dalle sPLA₂ ([Figura 20](#)). Studi iniziali avevano dimostrato che le sPLA₂ possono attivare le MAPK in alcune linee cellulari con un meccanismo recettore-mediato [105, 120]. Più recentemente è stato riportato che nelle cellule infiammatorie, le sPLA₂ possono attivare le MAPK p38 ed ERK1/2 in maniera alternativa. Ad esempio, Baek *et al.* hanno riportato che la hGIIA attiva ERK1/2, ma non p38, nei macrofagi murini RAW264.7 [59]. Altri due studi realizzati sui neutrofili umani hanno riportato che la GIB porcina (pGIB) può attivare alternativamente p38 [45] oppure ERK1/2 [57]. I risultati del nostro studio dimostrano per la prima volta che diverse sPLA₂ umane attivano sia p38 che ERK1/2 nei macrofagi umani e che queste chinasi sono necessarie per la produzione di citochine e chemochine. Inoltre, l'inibizione di ERK1/2 (con PD98059) o di p38 (con SB203580) determina solo un'inibizione parziale della secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8, mentre il blocco simultaneo di entrambe le chinasi la sopprime completamente. Questi dati indicano che p38 ed ERK1/2 cooperano per la sintesi ottimale di citochine e chemochine nei macrofagi polmonari attivati dalle sPLA₂.

Nelle cellule umane la fosforilazione delle MAPK è un evento relativamente tardivo che coinvolge diversi sistemi di trasduzione intracellulare attivati dai recettori di membrana [121]. Uno dei sistemi di membrana che si attiva più precocemente nelle cellule infiammatorie è il sistema PI3K/Akt, che è coinvolto in numerose risposte

biologiche quando queste cellule sono attivate da recettori di membrana [112]. Studi condotti in sistemi murini indicano che PI3K e il suo immediato substrato Akt/PKB sono coinvolti nella regolazione della forma inducibile della sintasi dell'ossido nitrico (iNOS) indotta dalla hGIIA nei macrofagi murini RAW 264.7 [60] e nell'espressione della metalloproteinasi-2 indotta dalla pGIB nei fibroblasti murini NIH-3T3 [122]. I nostri dati dimostrano per la prima volta che una sPLA₂ umana (hGX) attiva il sistema PI3K/Akt anche nei macrofagi umani e che tale sistema partecipa attivamente alle cascate di trasduzione che determinano la sintesi di citochine e chemochine. Infatti, un inibitore specifico di PI3K (LY294002) abolisce la secrezione di TNF- α e riduce la secrezione di CXCL8/IL-8 indotta dalla hGX negli HLM. Queste osservazioni suggeriscono che la PI3K può essere un punto di partenza importante delle cascate intracellulari che controllano la sintesi delle diverse citochine e chemochine nei macrofagi. Questa ipotesi è supportata dalla osservazione che l'inibitore di PI3K è anche in grado di prevenire la fosforilazione di ERK1/2, ma non di p38, indotta dalla hGX nei macrofagi.

Le sPLA₂ attivano la trascrizione genica delle citochine e chemochine prodotte dai macrofagi umani. Questo ultimo evento richiede l'attivazione di specifici fattori di trascrizione nucleare [97]NF- κ B è uno dei principali fattori di trascrizione nucleare che regolano la sintesi delle citochine e chemochine nelle cellule infiammatorie umane [115]. In questo studio abbiamo dimostrato che la hGX induce la fosforilazione e la conseguente degradazione di I κ B. Inoltre, due diversi inibitori di NF- κ B sopprimono la produzione di TNF- α e CXCL8/IL-8 indotta dalla hGX negli HLM. Queste osservazioni indicano che la sPLA₂ attiva NF- κ B nei macrofagi umani e che tale fattore di trascrizione nucleare svolge un ruolo fondamentale nel trasdurre al nucleo i segnali generati dalle sPLA₂ attraverso l'interazione con il recettore tipo M. Questo evento

verosimilmente richiede la partecipazione del sistema PI3K/Akt, ma non delle MAPK p38 ed ERK1/2, poiché solo l'inibitore di PI3K è in grado di prevenire la degradazione di I κ B indotta dalle sPLA₂.

L'insieme dei risultati ottenuti in questo studio può essere riassunto in uno scenario ipotetico schematizzato nella [Figura 20](#), che prevede come punto di partenza l'interazione delle sPLA₂ con il recettore tipo M sui macrofagi umani. Secondo questo schema il legame tra una sPLA₂ e il recettore tipo M genera un segnale intracellulare che attiva almeno tre diverse cascate di trasduzione che convergono a livello nucleare per indurre l'espressione genica di numerose citochine e chemochine e quindi per promuoverne la sintesi. In particolare, l'attivazione del sistema PI3K/Akt rappresenta un evento precoce che comporta la fosforilazione di chinasi intermedie che trasducono il segnale intracellulare alla MAPK ERK1/2 ed al fattore di trascrizione nucleare NF- κ B in maniera indipendente. Le conoscenze attuali sui meccanismi di trasduzione cellulare consentono di ipotizzare che il sistema PI3K/Akt possa attivare ERK1/2 verosimilmente attraverso il sistema della Proteina Chinasi C (PKC) che è in grado di trasdurre i segnali ai complessi Ras/Raf che a loro volta sono i responsabili della attivazione di ERK1/2 [106, 112, 121]. D'altra parte, è noto che il sistema PI3K/Akt può partecipare direttamente alle cascate di trasduzione che attivano NF- κ B nelle cellule immunitarie, attraverso l'interazione di Akt con le chinasi denominate IKK che sono responsabili della fosforilazione di I κ B [111, 113, 123]. La terza cascata di trasduzione attivata dalle sPLA₂ includerebbe l'attivazione della MAPK p38 che, secondo i nostri risultati, risulta indipendente da PI3K/Akt. Numerose evidenze indicano che questa MAPK non è sotto il controllo del sistema PI3K/Akt e che la sua attivazione dipende piuttosto dalla attività di una famiglia di chinasi denominate Rac [124]. È importante sottolineare che i nostri dati suggeriscono che le due cascate intracellulari che coinvolgono le MAPK p38 ed

ERK1/2 cooperano nell'attivare la produzione di citochine e chemochine. Questa convergenza potrebbero avvenire attivando direttamente o indirettamente, fattori di trascrizione nucleare diversi da NF- κ B (ATF-1/2, Elk-1, CREB, etc.) che rappresentano substrati preferenziali della attività di queste importanti chinasi intracellulari [106, 121, 124]. Comunque, anche se i risultati dei nostri esperimenti costituiscono un avanzamento significativo delle conoscenze sul *signaling* attivato dalle sPLA₂ nei macrofagi umani, questo modello ipotetico richiede ulteriori conferme.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che le sPLA₂ sono dei potenti stimoli in grado di indurre la produzione di citochine e chemochine nei macrofagi polmonari umani attraverso un meccanismo indipendente dall'attività enzimatica che richiede l'interazione con il recettore tipo M e l'attivazione di PI3K, ERK1/2, p38 e NF- κ B. Ad oggi, le sPLA₂ rappresentano uno dei più potenti agonisti endogeni per la attivazione dei macrofagi umani poiché riescono ad evocare risposte analoghe a quelle indotte da prodotti batterici come il LPS. Pertanto, l'attivazione dei macrofagi indotta dalle sPLA₂ via recettore tipo M potrebbe avere importanti ripercussioni fisiopatologiche in diverse malattie infiammatorie dell'apparato respiratorio sia acute (polmoniti, ARDS) che croniche (ad es. asma, BPCO, fibrosi). In queste patologie la produzione di citochine e chemochine attivate dalle sPLA₂ potrebbe contribuire all'induzione ed al mantenimento della flogosi, a promuovere il reclutamento di cellule infiammatorie e a modulare i processi di rimodellamento tissutale. Le sPLA₂ possono svolgere un ruolo multivalente nell'infiammazione attraverso meccanismi multipli che comprendono gli effetti legati alla attività enzimatica (sintesi di mediatori lipidici) e gli effetti mediati dalla interazione con i recettori di membrana (produzione di citochine, chemochine, metalloproteinasi, esocitosi di enzimi lisosomiali, etc.). È importante sottolineare che questi due meccanismi d'azione delle sPLA₂ sono strettamente integrati e spesso

cooperano per determinare un particolare effetto biologico [61]. Per tale motivo il ruolo delle sPLA₂ nell'infiammazione appare intrigante, ma risulta certamente molto complesso. Tuttavia, è ipotizzabile che farmaci in grado di bloccare gli effetti *in vivo* delle sPLA₂ debbano interferire con entrambe le attività di queste molecole (enzimatica e recettoriale). Questo scenario è confermato dai dati negativi ottenuti da alcuni studi *in vivo* che hanno utilizzato inibitori delle sPLA₂ che bloccavano esclusivamente la loro attività enzimatica. Infatti, pur avendo prodotto dei risultati incoraggianti in diversi modelli sperimentali animali [125-127], alcuni di questi inibitori si sono rivelati inefficaci nei *trials* clinici in pazienti con diverse malattie infiammatorie acute (sepsi severa) e croniche (artrite reumatoide ed asma) [88, 128, 129]. Pertanto, appare lecito prospettare che nuove molecole in grado di interferire contemporaneamente con l'attività enzimatica e con quella recettore-mediata delle sPLA₂, potrebbero, in futuro, rappresentare efficaci strumenti terapeutici per il trattamento delle malattie infiammatorie.

PUBBLICAZIONI CORRELATE

1. **Granata F.**, Petraroli A., Boilard E., Bezzine S., Bollinger J., Del Vecchio L., Gelb M.H., Lambeau G., Marone G., Triggiani M. *Activation of cytokine production by secreted phospholipases A₂ in human lung macrophages expressing the M-type receptor*. J. Immunol. 2005; 174: 464-474.
2. **Granata F.**, Frattini F., Loffredo S., Del Prete A., Sozzani S., Marone G., Triggiani M. *Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipases A₂ in human lung macrophages*. Eur. J. Immunol. 2006; 36:1938-1950.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R.J. Mayer, L.A. Marshall, New insights on mammalian phospholipase A₂; comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes, *FASEB J.* 7 (1993) 339-348.
- [2] M. Waite, Biochemistry, molecular biology, and physiology of phospholipase A₂ and its regulatory factors, *Adv Exp Med Biol* 279 (1990) 1-251.
- [3] K. Waku, Origins and fates of fatty acyl-CoA esters, *Biochim. Biophys. Acta* 1124 (1992) 101-111.
- [4] J.A. Cook, Eicosanoids, *Crit. Care Med.* 33 (2005) S488-491.
- [5] H. Tapiero, G.N. Ba, P. Couvreur, K.D. Tew, Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 215-222.
- [6] M.H. Graler, E.J. Goetzl, Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity, *Biochim Biophys Acta* 1582 (2002) 168-174.
- [7] I. Kudo, M. Murakami, Phospholipase A₂ enzymes, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69 (2002) 3-58.
- [8] C.C. Leslie, Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16709-16712.
- [9] B.L. Diaz, J.P. Arm, Phospholipase A(2), *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 69 (2003) 87-97.
- [10] K. Hamaguchi, H. Kuwata, K. Yoshihara, S. Masuda, S. Shimbara, S. Oh-ishi, M. Murakami, I. Kudo, Induction of distinct sets of secretory phospholipase A₂ in rodents during inflammation, *Biochim. Biophys. Acta* 1635 (2003) 37-47.

- [11] S. Masuda, M. Murakami, Y. Ishikawa, T. Ishii, I. Kudo, Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A₂ enzymes in several human tissues, *Biochim. Biophys. Acta* 1736 (2005) 200-210.
- [12] S. Masuda, M. Murakami, K. Komiyama, M. Ishihara, Y. Ishikawa, T. Ishii, I. Kudo, Various secretory phospholipase A₂ enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells, *Febs J.* 272 (2005) 655-672.
- [13] S. Masuda, M. Murakami, M. Mitsuishi, K. Komiyama, Y. Ishikawa, T. Ishii, I. Kudo, Expression of secretory phospholipase A₂ enzymes in lungs of humans with pneumonia and their potential prostaglandin-synthetic function in human lung-derived cells, *Biochem. J.* 387 (2005) 27-38.
- [14] N. Degousee, F. Ghomashchi, E. Stefanski, A. Singer, B.P. Smart, N. Borregaard, R. Reithmeier, T.F. Lindsay, C. Lichtenberger, W. Reinisch, G. Lambeau, J. Arm, J. Tischfield, M.H. Gelb, B.B. Rubin, Groups IV, V, and X phospholipases A₂s in human neutrophils: role in eicosanoid production and gram-negative bacterial phospholipid hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5061-5073.
- [15] F.F. Davidson, E.A. Dennis, Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms, *J. Mol. Evol.* 31 (1990) 228-238.
- [16] H.M. Verheij, A.J. Slotboom, G.H. de Haas, Structure and function of phospholipase A₂, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91 (1981) 91-203.
- [17] R.M. Kini, H.J. Evans, A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂, *Toxicon* 27 (1989) 613-635.

- [18] R.M. Kramer, C. Hession, B. Johansen, G. Hayes, P. McGray, E.P. Chow, R. Tizard, R.B. Pepinsky, Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5768-5775.
- [19] J.J. Seilhamer, W. Pruzanski, P. Vadas, S. Plant, J.A. Miller, J. Kloss, L.K. Johnson, Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5335-5338.
- [20] W. Uhl, T.J. Nevalainen, M.W. Buchler, Phospholipase A₂. Basic and clinical aspects in inflammatory diseases., Vol. 24, Karger, Basel, 1997.
- [21] J.M. Samet, M.C. Madden, A.N. Fonteh, Characterization of a secretory phospholipase A₂ in human bronchoalveolar lavage fluid, *Exp. Lung Res.* 22 (1996) 299-315.
- [22] S. Andersen, L. Bjerner, P.K. Selbo, M. Dalaker, B. Johansen, Extracellular phospholipase A₂ expression in sarcoidosis, *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 13 (1996) 70-76.
- [23] T.L. Benfield, R. van Steenwijk, T.L. Nielsen, J.R. Dichter, G.Y. Lipschik, B.N. Jensen, J. Junge, J.H. Shelhamer, J.D. Lundgren, Interleukin-8 and eicosanoid production in the lung during moderate to severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS: a role of interleukin-8 in the pathogenesis of *P. carinii* pneumonia, *Respir. Med.* 89 (1995) 285-290.
- [24] D.L. Bowton, M.C. Seeds, M.B. Fasano, B. Goldsmith, D.A. Bass, Phospholipase A₂ and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155 (1997) 421-425.

- [25] F.H. Chilton, F.J. Averill, W.C. Hubbard, A.N. Fonteh, M. Triggiani, M.C. Liu, Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 2235-2245.
- [26] D.K. Kim, T. Fukuda, B.T. Thompson, B. Cockrill, C. Hales, J.V. Bonventre, Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A₂ activities are increased in human adult respiratory distress syndrome, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) L109-118.
- [27] J. Sorensen, B. Kald, C. Tagesson, M. Lindahl, Platelet-activating factor and phospholipase A₂ in patients with septic shock and trauma, *Intensive Care Med.* 20 (1994) 555-561.
- [28] K. Kugiyama, Y. Ota, K. Takazoe, Y. Moriyama, H. Kawano, Y. Miyao, T. Sakamoto, H. Soejima, H. Ogawa, H. Doi, S. Sugiyama, H. Yasue, Circulating levels of secretory type II phospholipase A₂ predict coronary events in patients with coronary artery disease, *Circulation* 100 (1999) 1280-1284.
- [29] M.M. Haapamaki, J.M. Gronroos, H. Nurmi, K. Alanen, T.J. Nevalainen, Gene expression of group II phospholipase A₂ in intestine in Crohn's disease, *Am J Gastroenterol* 94 (1999) 713-720.
- [30] M.M. Haapamaki, J.M. Gronroos, H. Nurmi, K. Irjala, K.A. Alanen, T.J. Nevalainen, Phospholipase A₂ in serum and colonic mucosa in ulcerative colitis, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 59 (1999) 279-287.
- [31] M.M. Haapamaki, J.M. Gronroos, H. Nurmi, K. Soderlund, H. Peuravuori, K. Alanen, T.J. Nevalainen, Elevated group II phospholipase A₂ mass concentration in serum and colonic mucosa in Crohn's disease, *Clin. Chem. Lab. Med.* 36 (1998) 751-755.
- [32] T. Schroder, E. Kivilaakso, P.K. Kinnunen, M. Lempinen, Serum phospholipase A₂ in human acute pancreatitis, *Scand. J. Gastroenterol.* 15 (1980) 633-636.

- [33] P. Vadas, Elevated plasma phospholipase A₂ levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock, *J. Lab. Clin. Med.* 104 (1984) 873-881.
- [34] A.D. Romaschin, W.C. DeMajo, T. Winton, M. D'Costa, G. Chang, B. Rubin, Z. Gamliel, P.M. Walker, Systemic phospholipase A₂ and cachectin levels in adult respiratory distress syndrome and multiple-organ failure, *Clin. Biochem.* 25 (1992) 55-60.
- [35] H. Nakae, S. Endo, K. Inada, H. Yamashita, Y. Yamada, T. Takakuwa, T. Kasai, M. Ogawa, K. Uchida, Plasma concentrations of type II phospholipase A₂, cytokines and eicosanoids in patients with burns, *Burns* 21 (1995) 422-426.
- [36] D.A. Partrick, E.E. Moore, C.C. Silliman, C.C. Barnett, F.A. Kuypers, Secretory phospholipase A₂ activity correlates with postinjury multiple organ failure, *Crit. Care Med.* 29 (2001) 989-993.
- [37] K. Kugiyama, Y. Ota, S. Sugiyama, H. Kawano, H. Doi, H. Soejima, S. Miyamoto, H. Ogawa, K. Takazoe, H. Yasue, Prognostic value of plasma levels of secretory type II phospholipase A₂ in patients with unstable angina pectoris, *Am J Cardiol* 86 (2000) 718-722.
- [38] J.S. Bomalaski, P. Lawton, J.L. Browning, Human extracellular recombinant phospholipase A₂ induces an inflammatory response in rabbit joints, *J. Immunol.* 146 (1991) 3904-3910.
- [39] W. Pruzanski, P. Vadas, V. Fornasier, Inflammatory effect of intradermal administration of soluble phospholipase A₂ in rabbits, *J. Invest. Dermatol.* 86 (1986) 380-383.
- [40] S.K. Durham, W.M. Selig, Phospholipase A₂-induced pathophysiologic changes in the guinea pig lung, *Am. J. Pathol.* 136 (1990) 1283-1291.

- [41] J.E. Tocker, S.K. Durham, A.F. Welton, W.M. Selig, Phospholipase A₂-induced pulmonary and hemodynamic responses in the guinea pig. Effects of enzyme inhibitors and mediators antagonists, *Am. Rev. Respir. Dis.* 142 (1990) 1193-1199.
- [42] P. Vadas, W. Pruzanski, Role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease, *Lab. Invest.* 55 (1986) 391-404.
- [43] F. Granata, B. Balestrieri, A. Petraroli, G. Giannattasio, G. Marone, M. Triggiani, Secretory phospholipases A₂ as multivalent mediators of inflammatory and allergic disorders, *Int Arch Allergy Immunol* 131 (2003) 153-163.
- [44] M. Murakami, N. Hara, I. Kudo, K. Inoue, Triggering of degranulation in mast cells by exogenous type II phospholipase A₂, *J. Immunol.* 151 (1993) 5675-5684.
- [45] C.C. Silliman, E.E. Moore, G. Zallen, R. Gonzalez, J.L. Johnson, D.J. Elzi, X. Meng, K. Hanasaki, J. Ishizaki, H. Arita, L. Ao, K.M. England, A. Banerjee, Presence of the M-type sPLA₂ receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 283 (2002) C1102-1113.
- [46] M. Triggiani, F. Granata, B. Balestrieri, A. Petraroli, G. Scalia, L. Del Vecchio, G. Marone, Secretory phospholipases A₂ activate selective functions in human eosinophils, *J. Immunol.* 170 (2003) 3279-3288.
- [47] M. Triggiani, F. Granata, A. Oriente, V. De Marino, M. Gentile, C. Calabrese, C. Palumbo, G. Marone, Secretory phospholipases A₂ induce β -glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages, *J. Immunol.* 164 (2000) 4908-4915.

- [48] M. Hernandez, L. Fuentes, F.J. Fernandez Aviles, M.S. Crespo, M.L. Nieto, Secretory phospholipase A₂ elicits proinflammatory changes and upregulates the surface expression of fas ligand in monocytic cells: potential relevance for atherogenesis, *Circ. Res.* 90 (2002) 38-45.
- [49] L. Perrin-Cocon, S. Agaue, F. Coutant, A. Masurel, S. Bezzine, G. Lambeau, P. Andre, V. Lotteau, Secretory phospholipase A₂ induces dendritic cell maturation, *Eur. J. Immunol.* 34 (2004) 2293-2302.
- [50] R. Ramoner, T. Putz, H. Gander, A. Rahm, G. Bartsch, C. Schaber, M. Thurnher, Dendritic-cell activation by secretory phospholipase A₂, *Blood* 105 (2005) 3583-3587.
- [51] J. Takasaki, Y. Kawauchi, T. Yasunaga, Y. Masuho, Human type II phospholipase A₂-induced Mac-1 expression on human neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 60 (1996) 174-180.
- [52] A. Gambero, E.C. Landucci, M.H. Toyama, S. Marangoni, J.R. Giglio, H.B. Nader, C.P. Dietrich, G. De Nucci, E. Antunes, Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans, *Biochem Pharmacol* 63 (2002) 65-72.
- [53] M.T. Rizzo, E. Nguyen, M. Aldo-Benson, G. Lambeau, Secreted phospholipase A(2) induces vascular endothelial cell migration, *Blood* 96 (2000) 3809-3815.
- [54] I.B. Sundell, K.A. Aziz, M. Zuzel, R.D. Theakston, The role of phospholipases A₂ in the stimulation of neutrophil motility by cobra venoms, *Toxicon* 41 (2003) 459-468.
- [55] M. Triggiani, F. Granata, A. Oriente, M. Gentile, A. Petraroli, B. Balestrieri, G. Marone, Secretory phospholipases A₂ induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes, *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 67-76.

- [56] G. Beck, B.A. Yard, J. Schulte, M. Haak, K. van Ackern, F.J. van der Woude, M. Kaszkin, Secreted phospholipases A₂ induce the expression of chemokines in microvascular endothelium, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (2003) 731-737.
- [57] E.J. Jo, H.Y. Lee, Y.N. Lee, J.I. Kim, H.K. Kang, D.W. Park, S.H. Baek, J.Y. Kwak, Y.S. Bae, Group IB secretory phospholipase A₂ stimulates CXC chemokine ligand 8 production via ERK and NF-kappaB in human neutrophils, *J. Immunol.* 173 (2004) 6433-6439.
- [58] S.H. Baek, T.K. Kwon, J.H. Lim, Y.J. Lee, H.W. Chang, S.J. Lee, J.H. Kim, K.B. Kwun, Secretory phospholipase A₂-potentiated inducible nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF-kappa B activation, *J. Immunol.* 164 (2000) 6359-6365.
- [59] S.H. Baek, J.H. Lim, D.W. Park, S.Y. Kim, Y.H. Lee, J.R. Kim, J.H. Kim, Group IIA secretory phospholipase A₂ stimulates inducible nitric oxide synthase expression via ERK and NF-kB in macrophages, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 2709-2717.
- [60] D.W. Park, J.R. Kim, S.Y. Kim, J.K. Sonn, O.S. Bang, S.S. Kang, J.H. Kim, S.H. Baek, Akt as a mediator of secretory phospholipase A₂ receptor-involved inducible nitric oxide synthase expression, *J. Immunol.* 170 (2003) 2093-2099.
- [61] M. Triggiani, F. Granata, A. Frattini, G. Marone, Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A(2), *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 1289-1300.
- [62] M. Triggiani, F. Granata, G. Giannattasio, G. Marone, Secretory phospholipases A₂ in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes, *J. Allergy Clin. Immunol.* 116 (2005) 1000-1006.

- [63] A.G. Singer, F. Ghomashchi, C. Le Calvez, J. Bollinger, S. Bezzine, M. Rouault, M. Sadilek, E. Nguyen, M. Lazdunski, G. Lambeau, M.H. Gelb, Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂, J. Biol. Chem. 277 (2002) 48535-48549.
- [64] S. Beck, G. Lambeau, K. Scholz-Pedretti, M.H. Gelb, M.J. Janssen, S.H. Edwards, D.C. Wilton, J. Pfeilschifter, M. Kaszkin, Potentiation of tumor necrosis factor alpha-induced secreted phospholipase A₂ (sPLA₂)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA₂ and peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation, J. Biol. Chem. 278 (2003) 29799-29812.
- [65] C.M. Mounier, P. Luchetta, C. Lecut, R.S. Koduri, G. Faure, G. Lambeau, E. Valentin, A. Singer, F. Ghomashchi, S. Beguin, M.H. Gelb, C. Bon, Basic residues of human group IIA phospholipase A₂ are important for binding to factor Xa and prothrombinase inhibition comparison with other mammalian secreted phospholipases A₂, Eur. J. Biochem. 267 (2000) 4960-4969.
- [66] M. Rouault, L.D. Rash, P. Escoubas, E. Boilard, J. Bollinger, B. Lomonte, T. Maurin, C. Guillaume, S. Canaan, C. Deregnaucourt, J. Schrevel, A. Doglio, J.M. Gutierrez, M. Lazdunski, M.H. Gelb, G. Lambeau, Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A₂ OS₂: the N-terminal region is more important than enzymatic activity, Biochemistry 45 (2006) 5800-5816.
- [67] E. Valentin, G. Lambeau, Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins, Biochim. Biophys. Acta 1488 (2000) 59-70.

- [68] M. Murakami, T. Kambe, S. Shimbara, S. Yamamoto, H. Kuwata, I. Kudo, Functional association of type IIA secretory phospholipase A₂ with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29927-29936.
- [69] P. Sartipy, G. Bondjers, E. Hurt-Camejo, Phospholipase A₂ type II binds to extracellular matrix biglycan: modulation of its activity on LDL by colocalization in glycosaminoglycan matrixes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 1934-1941.
- [70] P. Sartipy, B. Johansen, K. Gasvik, E. Hurt-Camejo, Molecular basis for the association of group IIA phospholipase A₂ and decorin in human atherosclerotic lesions, *Circ. Res.* 86 (2000) 707-714.
- [71] G. Lambeau, M. Lazdunski, Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂, *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999) 162-170.
- [72] G. Lambeau, J. Barhanin, H. Schweitz, J. Qar, M. Lazdunski, Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 11503-11510.
- [73] J.P. Nicolas, Y. Lin, G. Lambeau, F. Ghomashchi, M. Lazdunski, M.H. Gelb, Localization of structural elements of bee venom phospholipase A₂ involved in N-type receptor binding and neurotoxicity, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7173-7181.
- [74] G. Lambeau, A. Schmid-Alliana, M. Lazdunski, J. Barhanin, Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A₂ in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9526-9532.

- [75] K. Hanasaki, H. Arita, Phospholipase A₂ receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A₂, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69 (2002) 71-82.
- [76] P. Ancian, G. Lambeau, M.G. Mattei, M. Lazdunski, The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A₂. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 8963-8970.
- [77] G. Lambeau, P. Ancian, J. Barhanin, M. Lazdunski, Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A₂, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1575-1578.
- [78] L. East, C.M. Isacke, The mannose receptor family, *Biochim. Biophys. Acta* 1572 (2002) 364-386.
- [79] W. Jiang, W.J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing, *Nature* 375 (1995) 151-155.
- [80] J.M. Wu, G.Y. Sun, Effects of IL-1 beta on receptor-mediated polyphosphoinositide signaling pathway in immortalized astrocytes (DITNC), *Neurochem. Res.* 22 (1997) 1309-1315.
- [81] J.P. Nicolas, G. Lambeau, M. Lazdunski, Identification of the binding domain for secretory phospholipases A₂ on their M-type 180-kDa membrane receptor, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 28869-28873.
- [82] G. Lambeau, P. Ancian, J.P. Nicolas, S.H. Beiboer, D. Moinier, H. Verheij, M. Lazdunski, Structural elements of secretory phospholipases A₂ involved in the binding to M-type receptors, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5534-5540.

- [83] P. Ancian, G. Lambeau, M. Lazdunski, Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A₂, *Biochemistry* 34 (1995) 13146-13151.
- [84] E. Zvaritch, G. Lambeau, M. Lazdunski, Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A₂, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 250-257.
- [85] L. Cupillard, R. Mulherkar, N. Gomez, S. Kadam, E. Valentin, M. Lazdunski, G. Lambeau, Both group IB and group IIA secreted phospholipases A₂ are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7043-7051.
- [86] Y. Yokota, K. Higashino, K. Nakano, H. Arita, K. Hanasaki, Identification of group X secretory phospholipase A₂ as a natural ligand for mouse phospholipase A₂ receptor, *FEBS Lett.* 478 (2000) 187-191.
- [87] K. Higashino, J. Ishizaki, J. Kishino, O. Ohara, H. Arita, Structural comparison of phospholipase-A₂-binding regions in phospholipase-A₂ receptors from various mammals, *Eur J Biochem* 225 (1994) 375-382.
- [88] D.L. Bowton, A.A. Dmitrienko, E. Israel, B.G. Zeiher, G.D. Sides, Impact of a soluble phospholipase A₂ inhibitor on inhaled allergen challenge in subjects with asthma, *J. Asthma* 42 (2005) 65-71.
- [89] M.C. Seeds, K.A. Jones, R. Duncan Hite, M.C. Willingham, H.M. Borgerink, R.D. Woodruff, D.L. Bowton, D.A. Bass, Cell-specific expression of group X and group V secretory phospholipases A₂ in human lung airway epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 23 (2000) 37-44.
- [90] C.E. Lewis, J. McGee, *The Macrophage*, IRL Press, Oxford, 1992.

- [91] M.L. Lohmann-Matthes, C. Steinmuller, G. Franke-Ullmann, Pulmonary macrophages, *Eur. Respir. J.* 7 (1994) 1678-1689.
- [92] C.F. Nathan, Secretory products of macrophages, *J. Clin. Invest.* 79 (1987) 319-326.
- [93] P.R. Taylor, L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H.H. Lin, G.D. Brown, S. Gordon, Macrophage receptors and immune recognition, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 901-944.
- [94] T. Umino, C.M. Skold, S.J. Pirruccello, J.R. Spurzem, S.I. Rennard, Two-colour flow-cytometric analysis of pulmonary alveolar macrophages from smokers, *Eur Respir J* 13 (1999) 894-899.
- [95] G.W. Snedecor, *Statistical Methods*, Iowa State University Press, Ames, 1980.
- [96] R. Bonecchi, S. Sozzani, J.T. Stine, W. Luini, G. D'Amico, P. Allavena, D. Chantry, A. Mantovani, Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses, *Blood* 92 (1998) 2668-2671.
- [97] A.F. Holloway, S. Rao, M.F. Shannon, Regulation of cytokine gene transcription in the immune system, *Mol. Immunol.* 38 (2002) 567-580.
- [98] U.T. Ruegg, J. Rudinger, Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine, *Methods Enzymol.* 47 (1977) 111-116.
- [99] M.J. Janssen, W.A. van de Wiel, S.H. Beiboer, M.D. van Kampen, H.M. Verheij, A.J. Slotboom, M.R. Egmond, Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K, *Protein. Eng.* 12 (1999) 497-503.
- [100] S.H. Edwards, D. Thompson, S.F. Baker, S.P. Wood, D.C. Wilton, The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted

phospholipase A₂ at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism, *Biochemistry* 41 (2002) 15468-15476.

- [101] K. Sekar, R. Biswas, Y. Li, M. Tsai, M. Sundaralingam, Structures of the catalytic site mutants D99A and H48Q and the calcium-loop mutant D49E of phospholipase A₂, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55 (1999) 443-447.
- [102] S. Hagishita, M. Yamada, K. Shirahase, T. Okada, Y. Murakami, Y. Ito, T. Matsuura, M. Wada, T. Kato, M. Ueno, Y. Chikazawa, K. Yamada, T. Ono, I. Teshirogi, M. Ohtani, Potent inhibitors of secretory phospholipase A₂: synthesis and inhibitory activities of indolizine and indene derivatives, *J Med Chem* 39 (1996) 3636-3658.
- [103] Y. Yokota, K. Hanasaki, T. Ono, H. Nakazato, T. Kobayashi, H. Arita, Suppression of murine endotoxic shock by sPLA₂ inhibitor, indoxam, through group IIA sPLA₂-independent mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 1438 (1999) 213-222.
- [104] E. Boilard, M. Rouault, F. Surrel, C. Le Calvez, S. Bezzine, A. Singer, M.H. Gelb, G. Lambeau, Secreted phospholipase A₂ inhibitors are also potent blockers of binding to the M-type receptor, *Biochemistry* 45 (2006) 13203-13218.
- [105] M. Hernandez, S.L. Burillo, M.S. Crespo, M.L. Nieto, Secretory phospholipase A₂ activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A₂ in the human astrocytoma cell line 1321N1, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 606-612.
- [106] C. Dong, R.J. Davis, R.A. Flavell, MAP kinases in the immune response, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 55-72.

- [107] A.B. Carter, M.M. Monick, G.W. Hunninghake, Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 20 (1999) 751-758.
- [108] A. Cuenda, J. Rouse, Y.N. Doza, R. Meier, P. Cohen, T.F. Gallagher, P.R. Young, J.C. Lee, SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1, *FEBS Lett.* 364 (1995) 229-233.
- [109] S.P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors, *Biochem. J.* 351 (2000) 95-105.
- [110] D.R. Alessi, A. Cuenda, P. Cohen, D.T. Dudley, A.R. Saltiel, PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 27489-27494.
- [111] S.J. Park, S.C. Lee, S.H. Hong, H.M. Kim, Degradation of IkappaBalpha in activated RAW264.7 cells is blocked by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002, *Cell. Biol. Toxicol.* 18 (2002) 121-130.
- [112] D.A. Fruman, L.C. Cantley, Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems, *Semin. Immunol.* 14 (2002) 7-18.
- [113] P.J. Coffer, J. Jin, J.R. Woodgett, Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation, *Biochem. J.* 335 (Pt 1) (1998) 1-13.
- [114] C.J. Vlahos, W.F. Matter, K.Y. Hui, R.F. Brown, A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002), *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5241-5248.

- [115] T.S. Blackwell, J.W. Christman, The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 17 (1997) 3-9.
- [116] M. Karin, Y. Ben-Neriah, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 621-663.
- [117] M.A. Fiedler, K. Wernke-Dollries, J.M. Stark, Inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-8 release in A549 cells with the proteasome inhibitor MG-132, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 19 (1998) 259-268.
- [118] M. Tobe, Y. Isobe, H. Tomizawa, T. Nagasaki, H. Takahashi, T. Fukazawa, H. Hayashi, Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 383-391.
- [119] J. Adams, R. Stein, Novel inhibitors of the ptoteasome and their therapeutic use in inflammation., *Annu. Rep. Med. Chem.* 31 (1996) 279-287.
- [120] E. Kinoshita, N. Handa, K. Hanada, G. Kajiyama, M. Sugiyama, Activation of MAP kinase cascade induced by human pancreatic phospholipase A₂ in a human pancreatic cancer cell line, *FEBS Lett* 407 (1997) 343-346.
- [121] J. English, G. Pearson, J. Wilsbacher, J. Swantek, M. Karandikar, S. Xu, M.H. Cobb, New insights into the control of MAP kinase pathways, *Exp. Cell. Res.* 253 (1999) 255-270.
- [122] Y.A. Choi, H.K. Lim, J.R. Kim, C.H. Lee, Y.J. Kim, S.S. Kang, S.H. Baek, Group IB secretory phospholipase A2 promotes matrix metalloproteinase-2-mediated cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway, *J Biol Chem* 279 (2004) 36579-36585.
- [123] Y. Lu, L.M. Wahl, Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKK{alpha}/NF-{kappa}B pathway, *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 259-265.

- [124] T. Obata, G.E. Brown, M.B. Yaffe, MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway, *Crit. Care Med.* 28 (2000) N67-77.
- [125] S. Furue, K. Mikawa, K. Nishina, M. Shiga, M. Ueno, Y. Tomita, K. Kuwabara, I. Teshirogi, T. Ono, Y. Hori, A. Matsukawa, M. Yoshinaga, H. Obara, Therapeutic time-window of a group IIA phospholipase A₂ inhibitor in rabbit acute lung injury: correlation with lung surfactant protection, *Crit. Care Med.* 29 (2001) 719-727.
- [126] Y. Tomita, H. Jyoyama, M. Kobayashi, K. Kuwabara, S. Furue, M. Ueno, K. Yamada, T. Ono, I. Teshirogi, K. Nomura, H. Arita, I. Okayasu, Y. Hori, Role of group IIA phospholipase A₂ in rat colitis induced by dextran sulfate sodium, *Eur. J. Pharmacol.* 472 (2003) 147-158.
- [127] Y. Tomita, K. Kuwabara, S. Furue, K. Tanaka, K. Yamada, M. Ueno, T. Ono, T. Maruyama, T. Ajiki, H. Onoyama, M. Yamamoto, Y. Hori, Effect of a selective inhibitor of secretory phospholipase A₂, S-5920/LY315920Na, on experimental acute pancreatitis in rats, *J. Pharmacol. Sci.* 96 (2004) 144-154.
- [128] E. Abraham, C. Naum, V. Bandi, D. Gervich, S.F. Lowry, R. Wunderink, R.M. Schein, W. Macias, S. Skerjanec, A. Dmitrienko, N. Farid, S.T. Forgue, F. Jiang, Efficacy and safety of LY315920Na/S-5920, a selective inhibitor of 14-kDa group IIA secretory phospholipase A₂, in patients with suspected sepsis and organ failure, *Crit. Care Med.* 31 (2003) 718-728.
- [129] J.D. Bradley, A.A. Dmitrienko, A.J. Kivitz, O.S. Gluck, A.L. Weaver, C. Wiesenhuber, S.L. Myers, G.D. Sides, A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial of LY333013, a selective inhibitor of group II secretory phospholipase A₂, in the treatment of rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.* 32 (2005) 417-423.

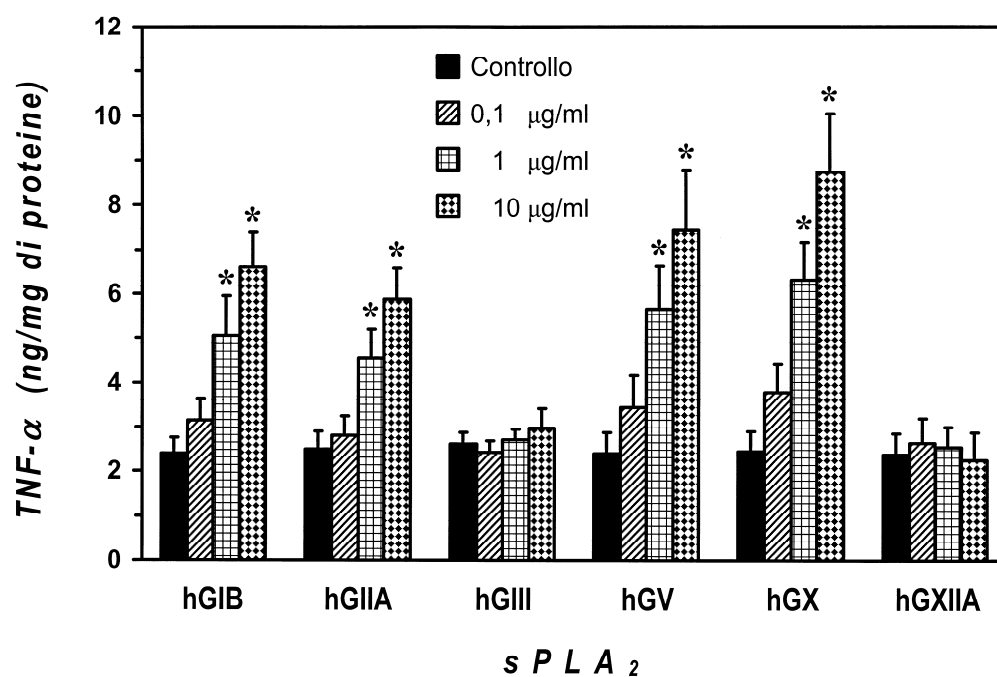


Figura 1: Effetto di diverse sPLA₂ sulla secrezione di TNF-α dagli HLM.

Le cellule sono state incubate (37°C, 6 ore) con le concentrazioni indicate di hGIB, hGIIA, hGIII, hGV, hGX e hGXIIA. La secrezione TNF-α è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I valori sono espressi come ng/mg di proteine totali. I dati sono la media ± ES di sei esperimenti.

* $p < 0,05$ vs verso il gruppo di controllo.

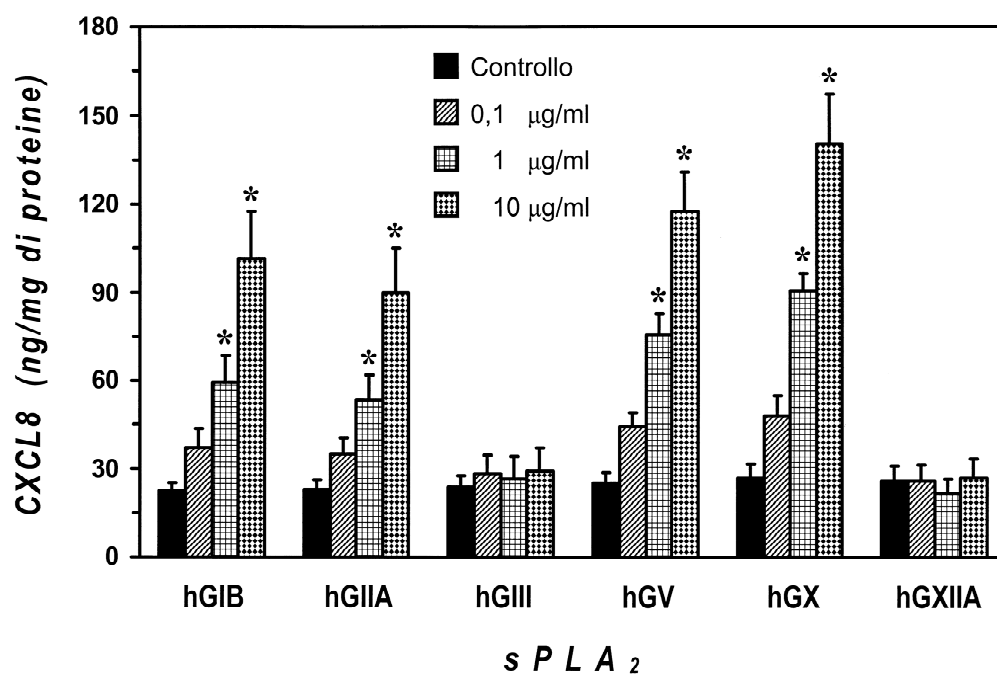


Figura 2: Effetto di diverse sPLA₂ sulla secrezione di CXCL8 dagli HLM.

Le cellule sono state incubate (37°C, 6 ore) con le concentrazioni indicate di hGIB, hGIIA, hGIII, hGV, hGX e hGXIIA. La secrezione CXCL8/IL-8 è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I valori sono espressi come ng/mg di proteine totali. I dati sono la media \pm ES di sei esperimenti.

* $p < 0,05$ vs verso il gruppo di controllo

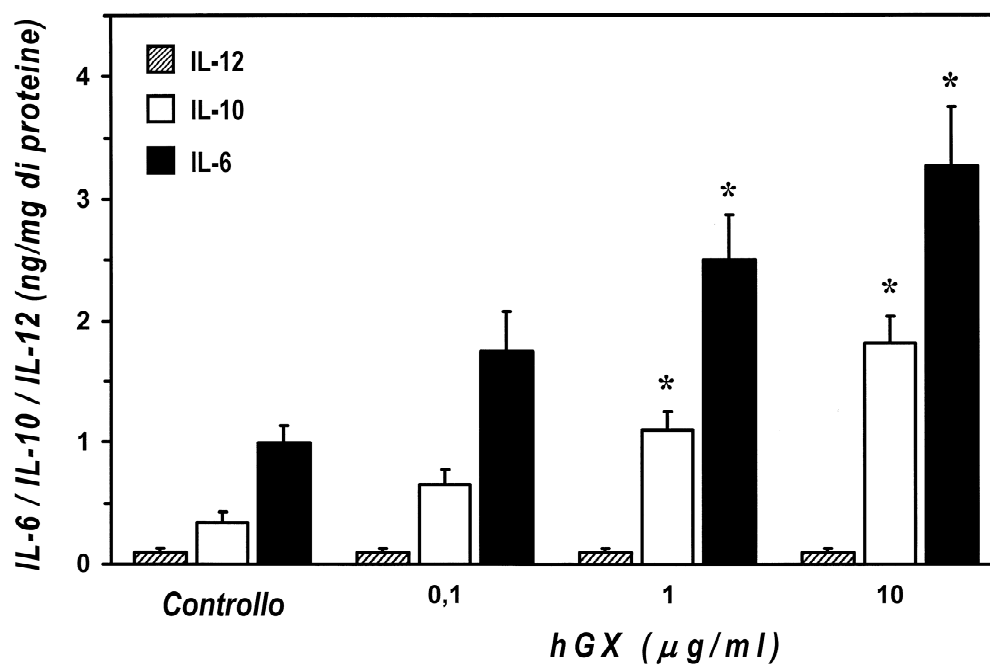


Figura 3: Effetto della hGX sulla secrezione di citochine dagli HLM.

Le cellule sono state incubate (37°C, 6 o 24 ore) con le concentrazioni indicate di hGX. La secrezione di IL-6, IL-10 e IL-12 è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I valori sono espressi come ng/mg di proteine totali. I dati sono la media \pm ES di sei esperimenti.

* p < 0,05 vs. verso il gruppo di controllo

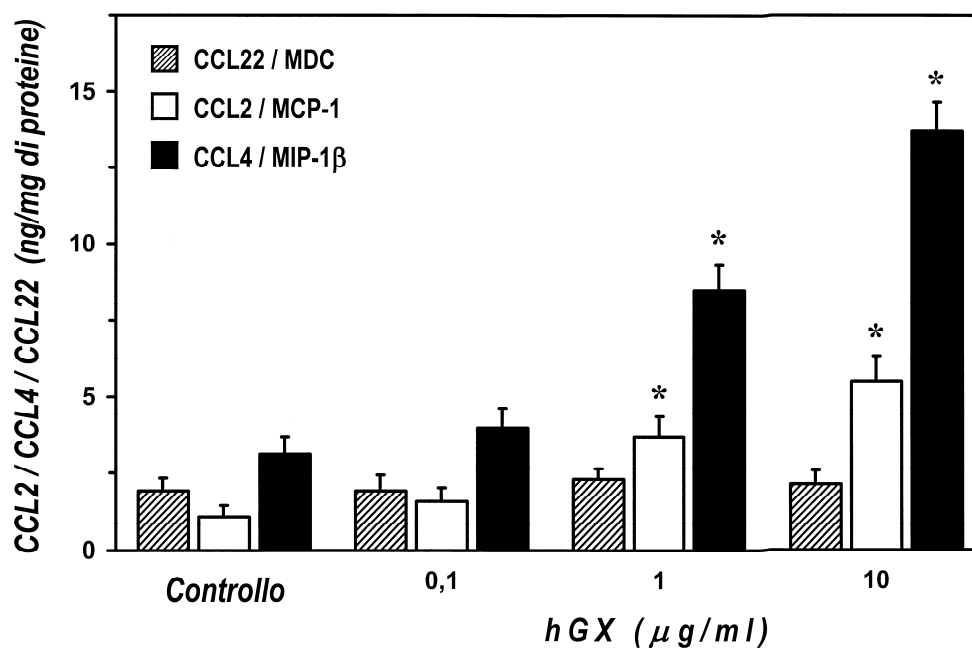


Figura 4: Effetto della hGX sulla secrezione di chemochine dagli HLM.

Le cellule sono state incubate (37°C, 6 o 24 ore) con le concentrazioni indicate di hGX. La secrezione di CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 α e CCL22/MDC è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I valori sono espressi come ng/mg di proteine totali. I dati sono la media \pm ES di sei esperimenti.

* p < 0,05 vs. verso il gruppo di controllo

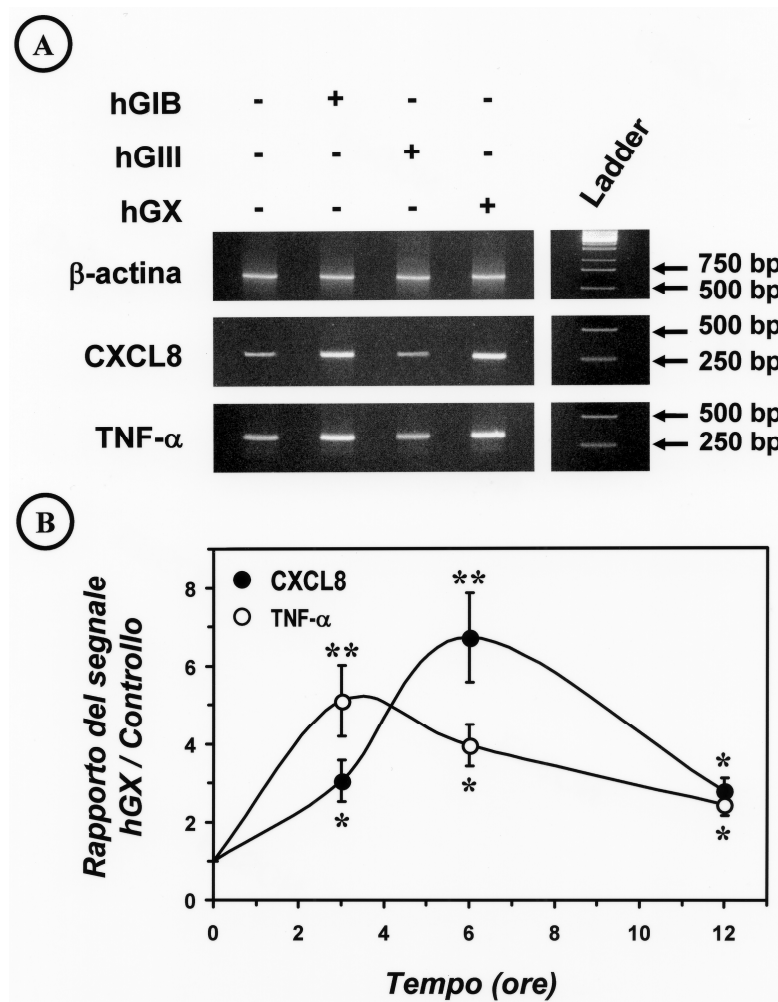


Figura 5: Effetto di diverse sPLA₂ sull'espressione dell'mRNA per TNF-α e CXCL8 negli HLM.

A) RT-PCR semiquantitativa dei prodotti di amplificazione specifici per CXCL8 (*seconda riga*), TNF-α (*terza riga*) e β-actina di un esperimento rappresentativo di tre in cui i HLM sono stati incubati (37°C, 3 ore) con RPMI o con 5 µg/ml di hGIB, hGIII o hGX.

B) RT-PCR quantitativa della cinetica di induzione dell'espressione degli mRNA del TNF-μ (○) e della CXCL8 (●) negli HLM incubati con 5 µg/ml di hGX per 3, 6 o 12 ore. La RT-PCR è stata eseguita con la tecnologia SYBR Green. I dati sono la media ± ES di tre esperimenti.

* $p < 0,05$ vs il gruppo di controllo.

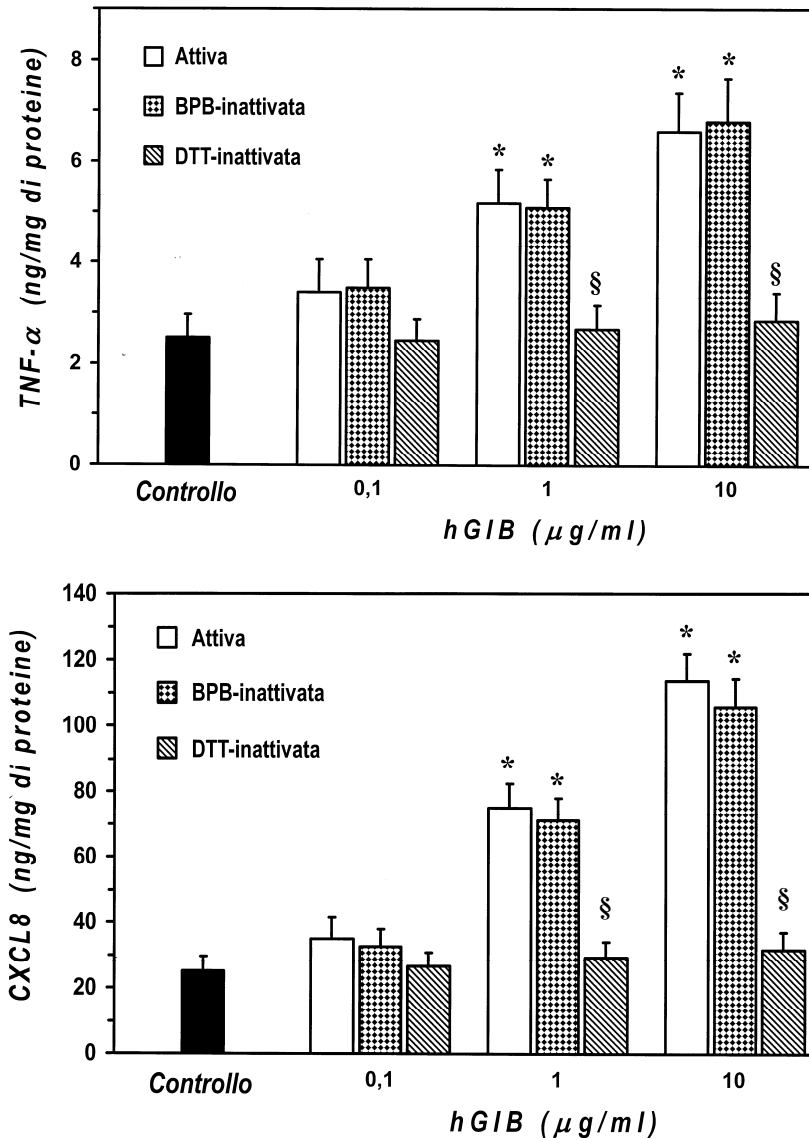


Figura 6: Effetto degli inibitori dell'attività enzimatica della sPLA₂ sulla secrezione di TNF-α e CXCL8 negli HLM.

Le cellule sono state incubate (37°C, 6 ore) con le concentrazioni indicate di hGIB attiva oppure con hGIB inattivata con BPB o DTT. Al termine dell'incubazione, la secrezione TNF-α e CXCL8 è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I dati sono la media ± ES di quattro esperimenti.

* p < 0,05 vs. verso il gruppo di controllo

§ p < 0,01 vs. verso il rispettivo gruppo trattato con hGIB attiva

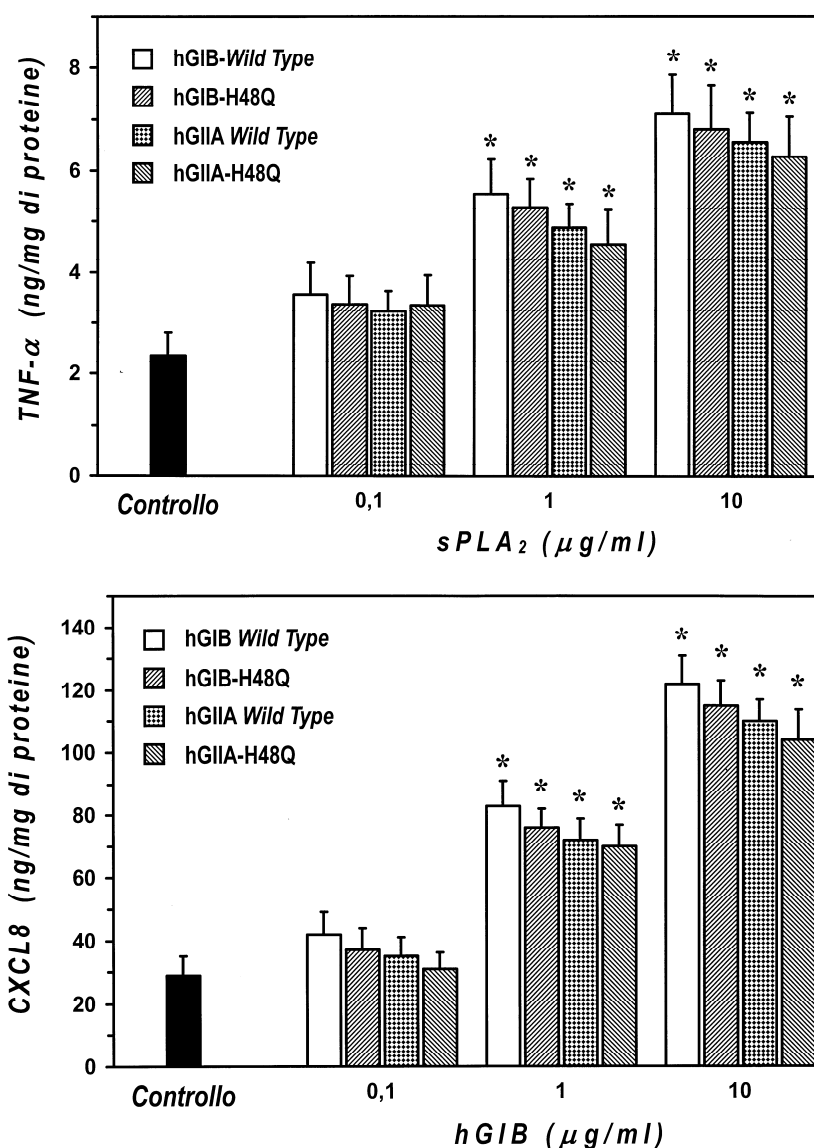


Figura 7: Ruolo dell'attività enzimatica delle sPLA₂ sulla secrezione di TNF-α e CXCL8 negli HLM.

Le cellule sono state incubate (37°C, 6 ore) con le concentrazioni indicate di hGIB e hGIIA *wild type* o con i rispettivi mutanti H48Q (hGIB-H48Q; hGIIA-H48Q) cataliticamente inattivi. Al termine dell'incubazione, la secrezione TNF-α e CXCL8 è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I dati sono la media ± ES di quattro esperimenti.

* p < 0,05 vs. verso il gruppo di controllo

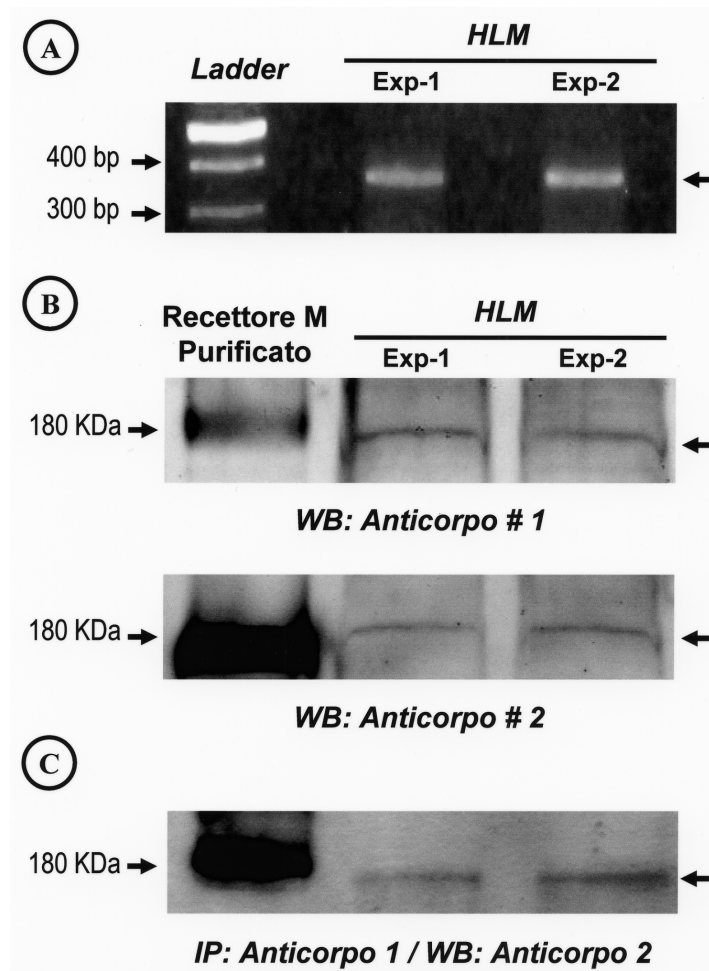


Figura 8: Espressione del recettore tipo M per le sPLA₂ negli HLM.

A) RT-PCR semiquantitativa dei prodotti di amplificazione specifici per il recettore tipo M in due diverse preparazioni di macrofagi (exp1 e exp2). Uno standard di DNA di 100 bp è stato utilizzato per la valutazione del numero di basi dei prodotti di amplificazione.

B) Western blot della proteina del recettore tipo M in lisati cellulari di due diverse preparazioni di macrofagi (exp1 e exp2). Le membrane sono state incubate con due tipi diversi di anticorpi diretti contro il recettore tipo M di coniglio (Ab 1) e di topo (Ab 2). Gli standard del recettore tipo M di coniglio e di topo sono stati utilizzati come controlli positivi.

C) Immunoprecipitazione (IP) della proteina del recettore tipo M in lisati cellulari di due diverse preparazioni di macrofagi (exp1 e exp2). Il recettore tipo M è stato immunoprecipitato utilizzando l'anticorpo diretto contro il recettore tipo M di coniglio (Ab 1) ed è stato visualizzato con l'anticorpo diretto contro il recettore tipo M di topo (Ab 2).

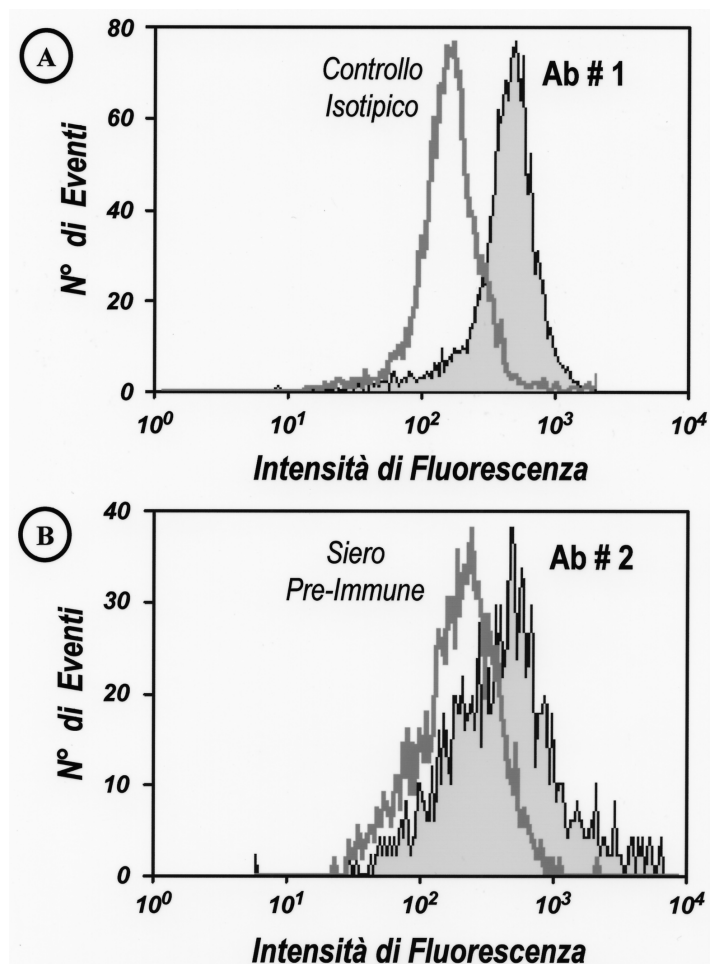


Figura 9: Espressione del recettore tipo M sulla superficie degli HLM.

Analisi citofluorimetrica di una preparazione di macrofagi polmonari incubati con due tipi diversi di anticorpi diretti contro il recettore tipo M di coniglio (Ab 1; pannello A) e di topo (Ab 2; pannello B) per la valutazione della presenza del recettore tipo M con immunofluorescenza indiretta. I controlli isotipici sono stati ottenuti incubando le cellule con un anticorpo irrilevante (pannello A) o con siero prelevato prima dell'immunizzazione (pannello B). Gli HLM sono stati trattati con cristal violetto per ridurre la forte autofluorescenza spontanea di queste cellule.

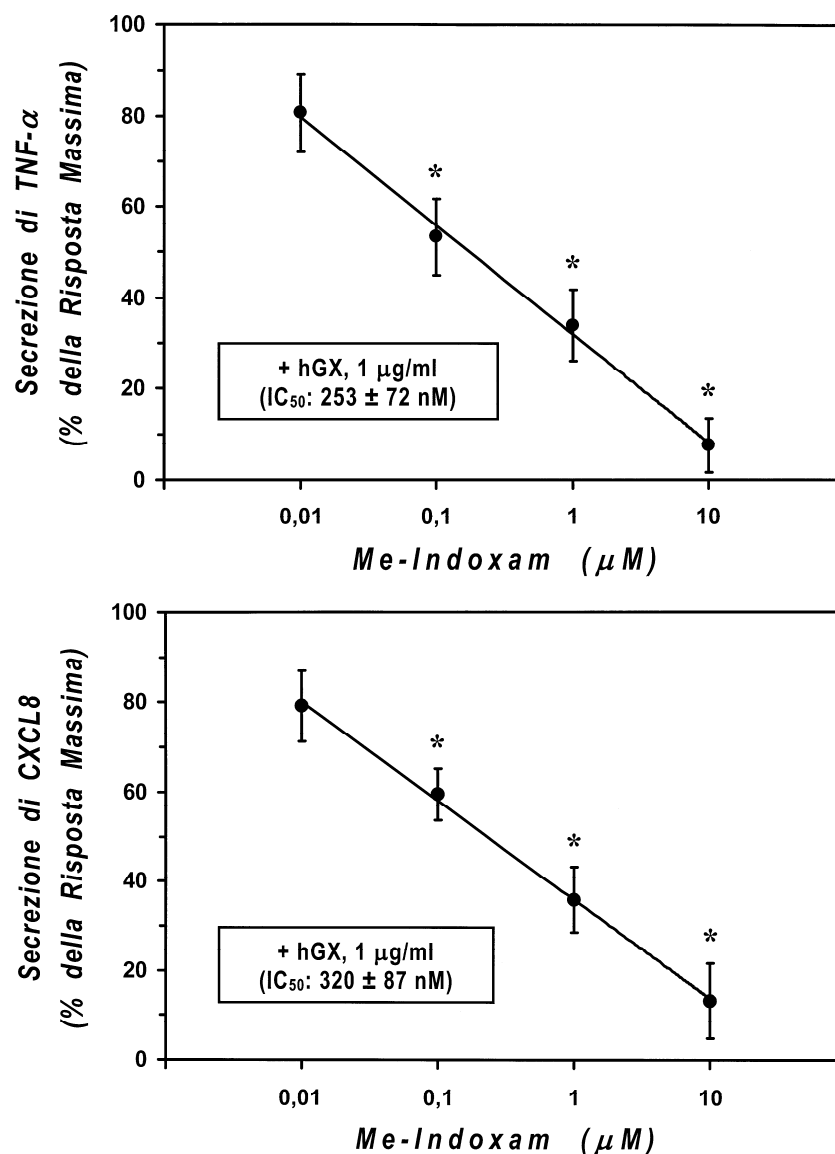


Figura 10: Effetto di Me-Indoxam sulla secrezione di TNF- α e CXCL8 indotta da hGX negli HLM.

La hGX (1 $\mu g/ml$) è stata incubata (37°C, 15 min) con o senza Me-Indoxam prima di essere aggiunta agli HLM (37°C, 6 ore). Al termine dell'incubazione, la secrezione di TNF- α (pannello superiore) e CXCL8/IL-8 (pannello inferiore) è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I risultati sono espressi come percento di inibizione della risposta massima indotta dalla hGX. I dati sono la media \pm ES di quattro esperimenti.

*p < 0,05 vs la hGX non trattata

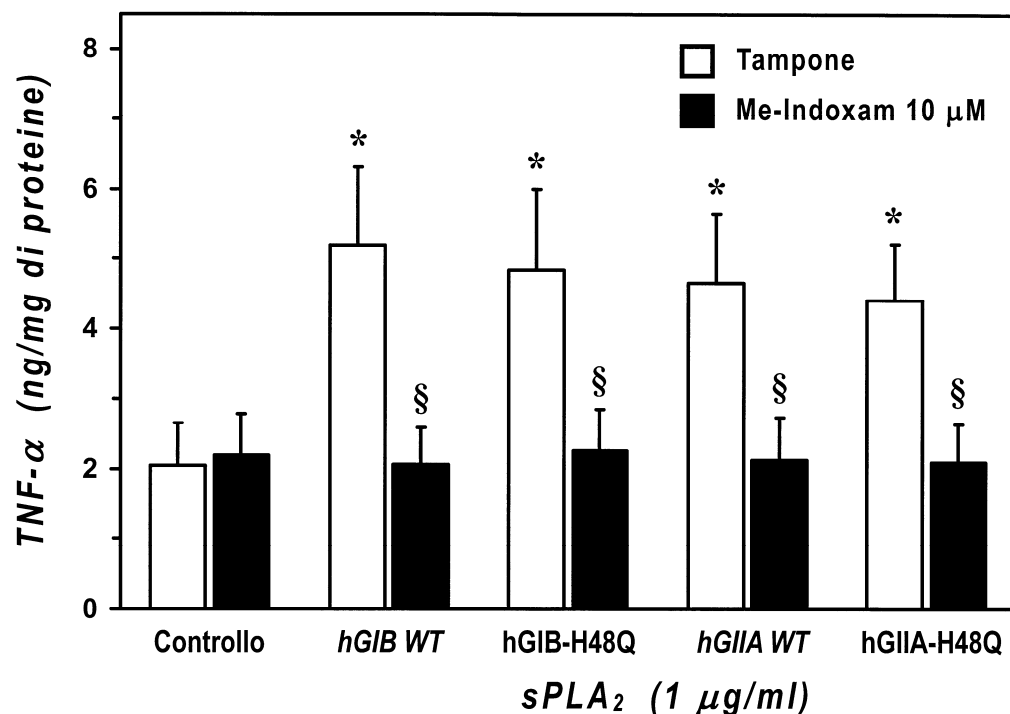


Figura 11: Effetto di Me-Indoxam sulla secrezione di TNF- α indotta da sPLA₂ *wild type* e dai rispettivi mutanti cataliticamente inattivi negli HLM.

La hGIB e la hGIIA *wild type* ed i rispettivi mutanti H48Q (hGIB-H48Q; hGIIA-H48Q (1 μg/ml) sono state incubate (37°C, 15 min) con o senza 10 μM Me-indoxam prima dell'aggiunta agli HLM (37°C, 6 ore). Al termine dell'incubazione, la secrezione di TNF- α è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I dati sono la media \pm ES di quattro esperimenti.

*p < 0,05 vs il gruppo di controllo

§, p < 0,01 vs i rispettivi gruppi non trattati (tampone)

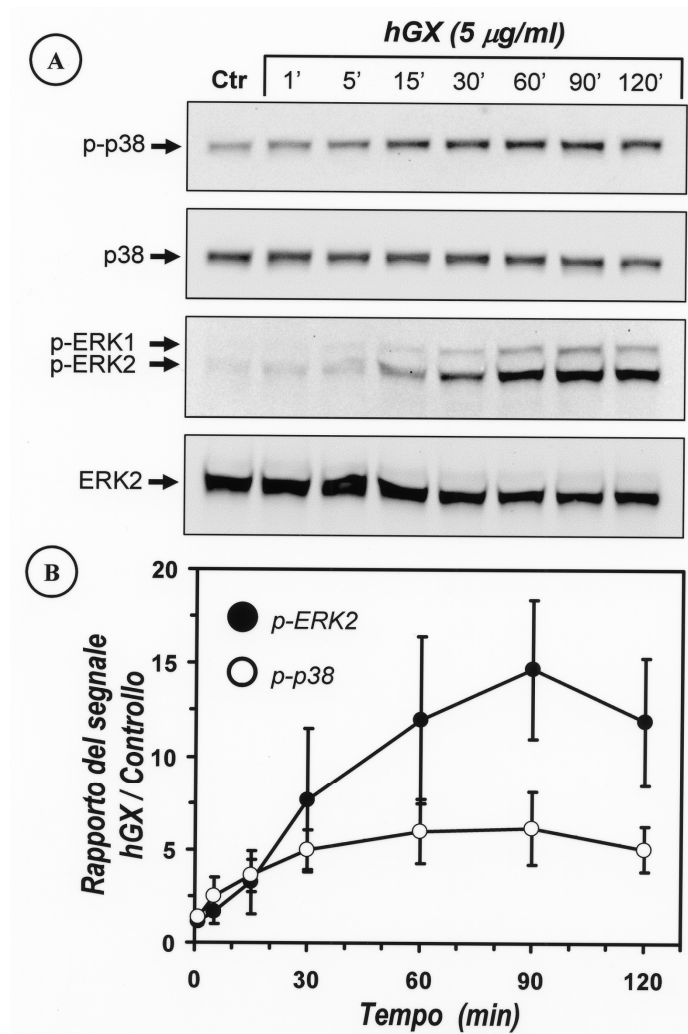


Figura 12: Effetto della hGX sulla fosforilazione di p38 ed ERK1/2 negli HLM.

A) Le cellule sono state stimulate con hGX (5 µg/ml) per i tempi indicati. Il western blot è stato eseguito con anticorpi anti-fosfo-p38 (primo gel) e anti-fosfo-ERK1/2 (terzo gel). Le membrane strippate sono state incubate successivamente con anticorpi anti-p38 (secondo gel) e anti-ERK2 (quarto gel) per confermare un uguale contenuto di proteine per campione. Western Blot rappresentativi di quattro esperimenti separati.

B) Analisi densitometrica delle cinetiche di fosforilazione di p38 ed ERK1/2 effettuata misurando le intensità dei segnali ai diversi tempi e calcolando il rapporto verso i campioni di controllo (*Ctrl*). La normalizzazione è stata ottenuta misurando le intensità dei segnali delle forme non fosforilate di p38 e ERK2. I dati sono la media \pm ES dei quattro esperimenti.

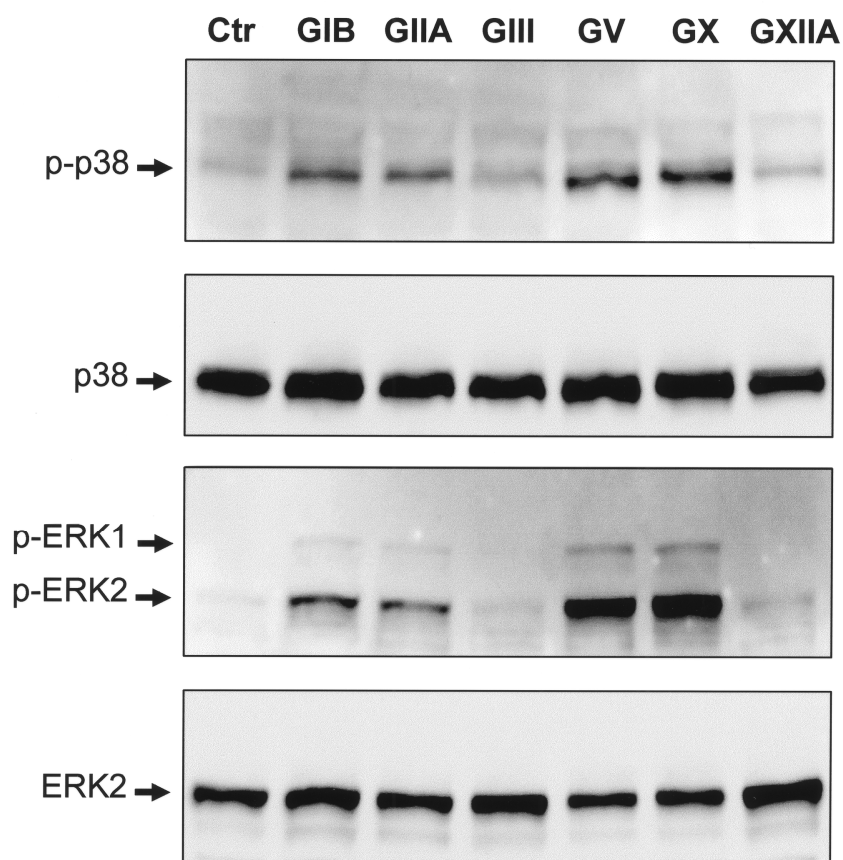


Figura 13: Effetto di diverse sPLA₂ sulla fosforilazione di p38 ed ERK1/2 negli HLM.

Le cellule sono state stimulate con hGIB, hGIIA, hGIII, hGV, hGX, hGXIIA (5 µg/ml) per 60 min. Il western blot è stato eseguito con anticorpi anti-fosfo-p38 (primo gel) e anti-fosfo-ERK1/2 (terzo gel). Le membrane strippate sono state incubate successivamente con anticorpi anti-p38 (secondo gel) e anti-ERK2 (quarto gel) per confermare un uguale contenuto di proteine per campione. I western blot sono rappresentativi di quattro esperimenti separati.

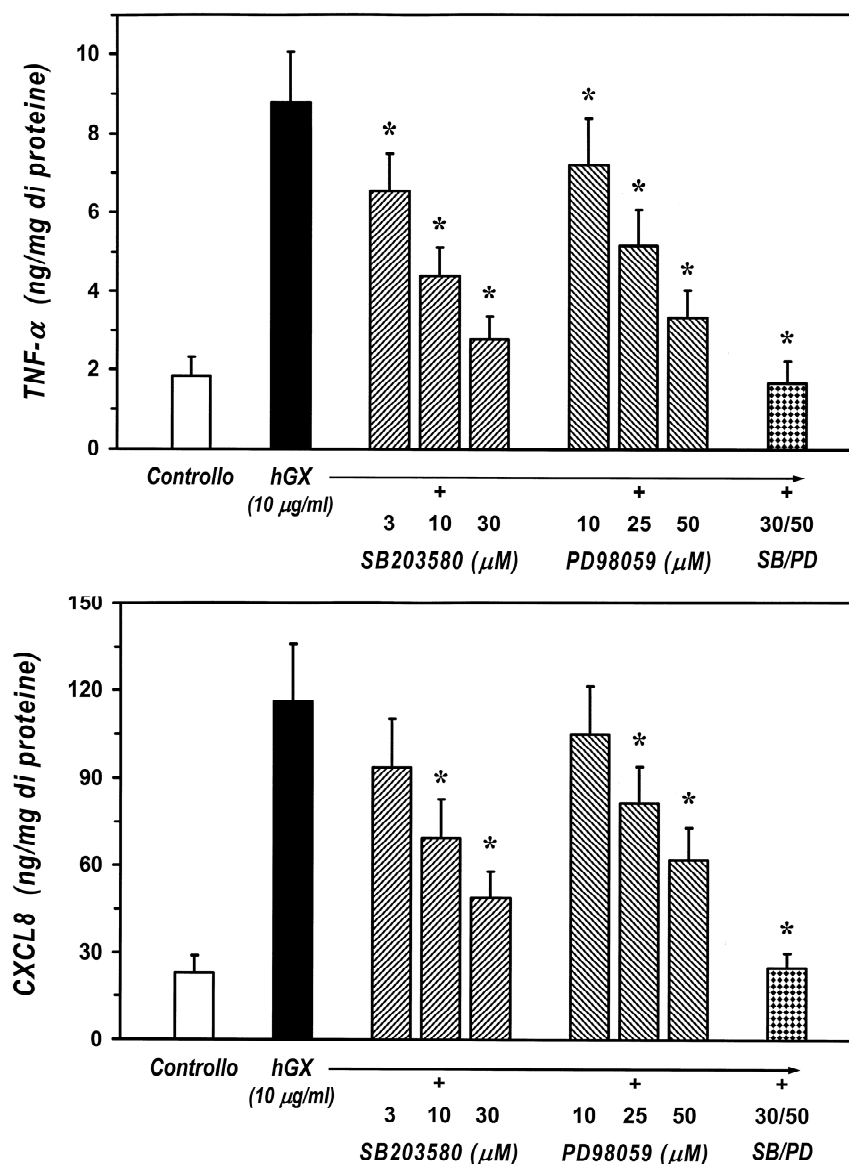


Figura 14: Effetto degli inibitori di p38 e di ERK1/2 sulla secrezione di TNF-α e CXCL8 indotta dalla hGX negli HLM.

Le cellule sono state preincubate (37°C, 1 ora) con SB203580 (3-30 μM), PD98059 (10-50 μM) o entrambi (30 μM di SB203580 + 50 μM di PD98059) e poi stimolati (37°C, 6 ore) con hGX (10 μg/ml). Al termine dell'incubazione, la secrezione di TNF-α (pannello superiore) e CXCL8/IL-8 (pannello inferiore) è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I dati sono la media ± ES di quattro esperimenti
 * p < 0,05 vs i campioni incubati con la sola hGX

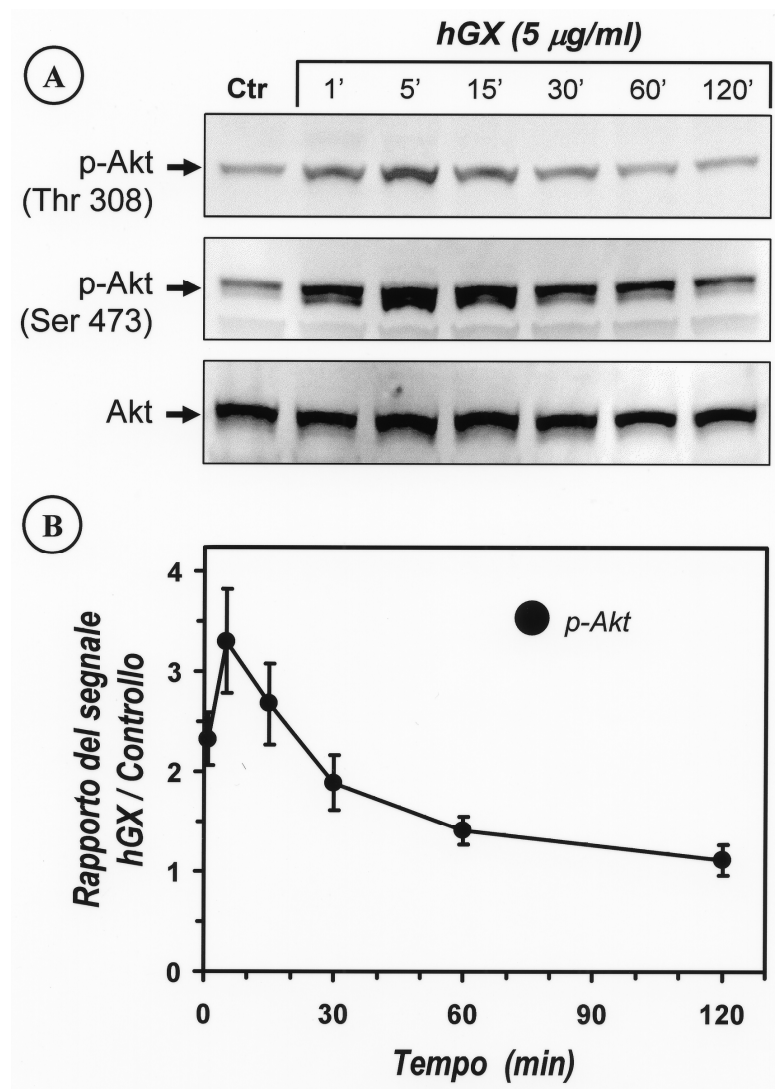


Figura 15: Effetto della hGX sulla fosforilazione di Akt negli HLM.

A) Le cellule sono state stimulate con hGX (5 $\mu\text{g/ml}$) per i tempi indicati. Il western blot è stato eseguito con anticorpi anti-fosfo-Akt-Thr308 (primo gel) e anti-fosfo-Akt-Ser473 (secondo gel). Le membrane strippate sono state incubate successivamente con un anticorpo anti-Akt (terzo gel) per confermare un uguale contenuto di proteine per campione. I western blot sono rappresentativi di quattro esperimenti separati.

B) Analisi densitometrica delle cinetiche di fosforilazione di Akt effettuata misurando le intensità dei segnali ai diversi tempi e calcolando il rapporto verso i campioni di controllo (*Ctr*). La normalizzazione è stata ottenuta misurando le intensità dei segnali della forma non fosforilata di Akt. I dati sono la media \pm ES dei quattro esperimenti.

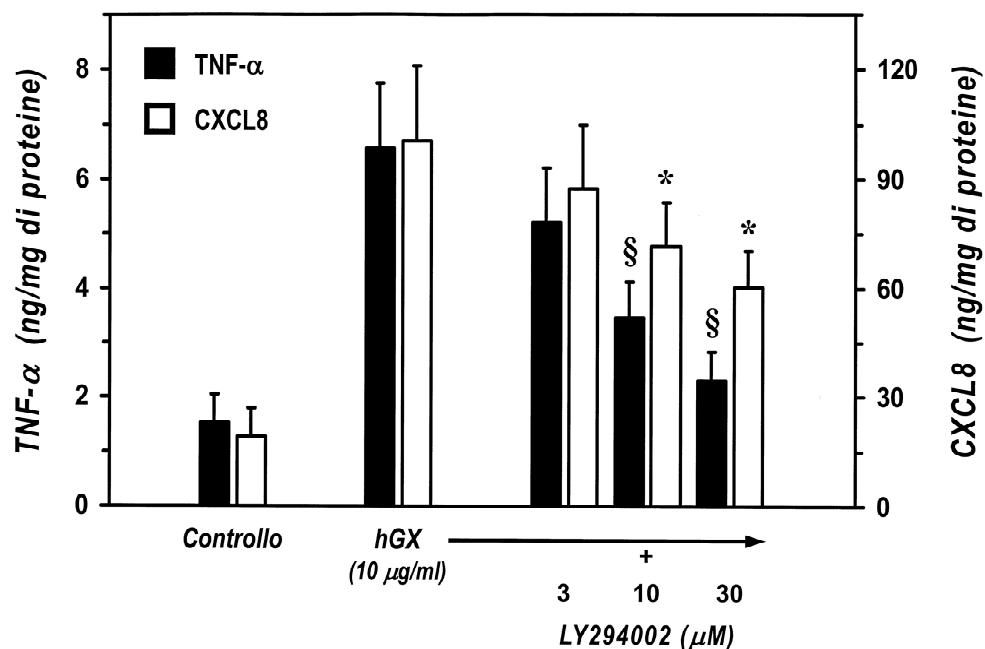


Figura 16: Effetto dell'inibitore di PI3K sulla secrezione di TNF- α e CXCL8 indotta dalla hGX negli HLM.

Le cellule sono state preincubate (37°C, 1 ora) con LY294002 (3-30 μ M) e poi stimolati (37°C, 6 ore) con hGX (10 μ g/ml). Al termine dell'incubazione, la secrezione di TNF- α e CXCL8/IL-8 è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I dati sono la media \pm ES di quattro esperimenti

* $p < 0,05$ vs i campioni incubati con la sola hGX

§ $p < 0,01$ vs i campioni incubati con la sola hGX

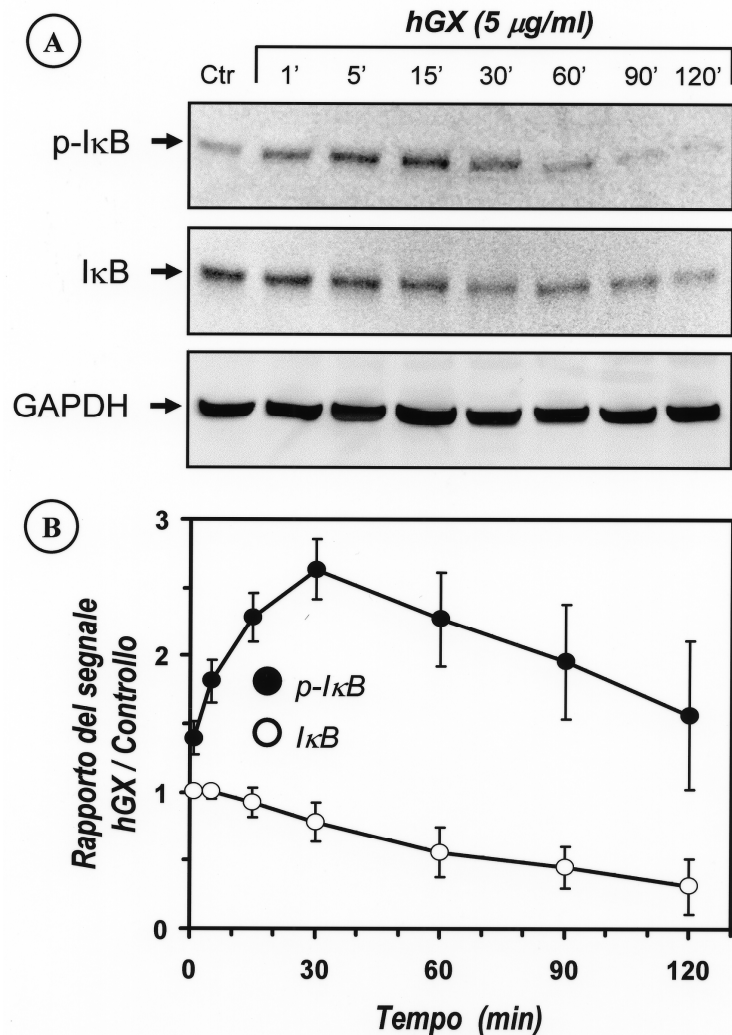


Figura 17: Effetto della hGX sulla fosforilazione e degradazione di IκB negli HLM.

A) Le cellule sono state stimulate con hGX (5 μg/ml) per i tempi indicati. Il western blot è stato eseguito con anticorpi anti-fosfo-IκBα ed anti-IκBα (secondo gel). Le membrane strippate sono state incubate successivamente con un anticorpo anti-GAPDH (terzo gel) per confermare un uguale contenuto di proteine per campione. I western blot sono rappresentativi di quattro esperimenti separati.

B) Analisi densitometrica delle cinetiche di fosforilazione e degradazione di IκB effettuata misurando le intensità dei segnali ai diversi tempi e calcolando il rapporto verso i campioni di controllo (Ctr). La normalizzazione è stata ottenuta misurando le intensità dei segnali di GAPDH. I dati sono la media ± ES dei quattro esperimenti.

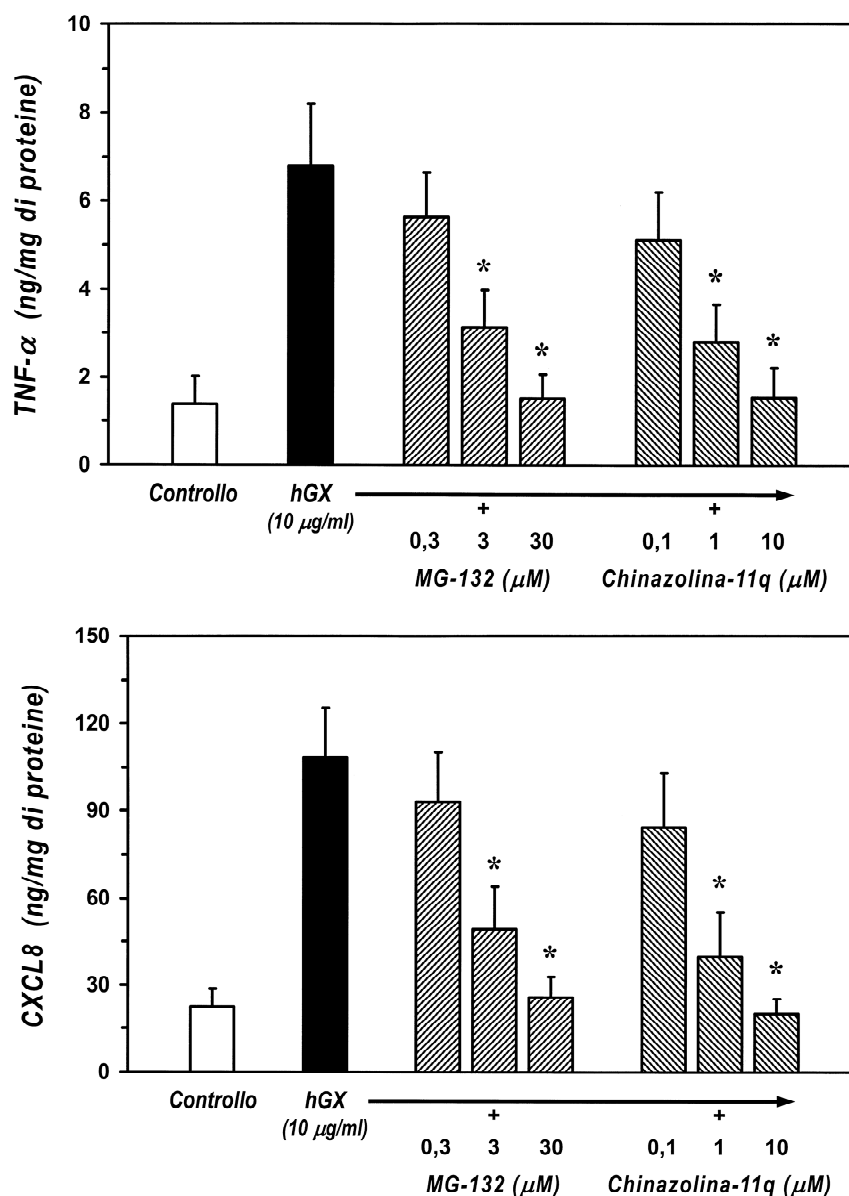


Figura 18: Effetto degli inibitori di NF-κB sulla secrezione di TNF-α e CXCL8 indotta dalla hGX negli HLM.

Le cellule sono state preincubate (37°C, 1 ora) con MG-132 (0,3-30 μM) o Chinazolina-11q (0,1-10 μM) e poi stimolati (37°C, 6 ore) con hGX (10 μg/ml). Al termine dell'incubazione, la secrezione di TNF-α (pannello superiore) e CXCL8/IL-8 (pannello inferiore) è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I dati sono la media ± ES di quattro esperimenti.

* p < 0,05 vs i campioni incubati con la sola hGX

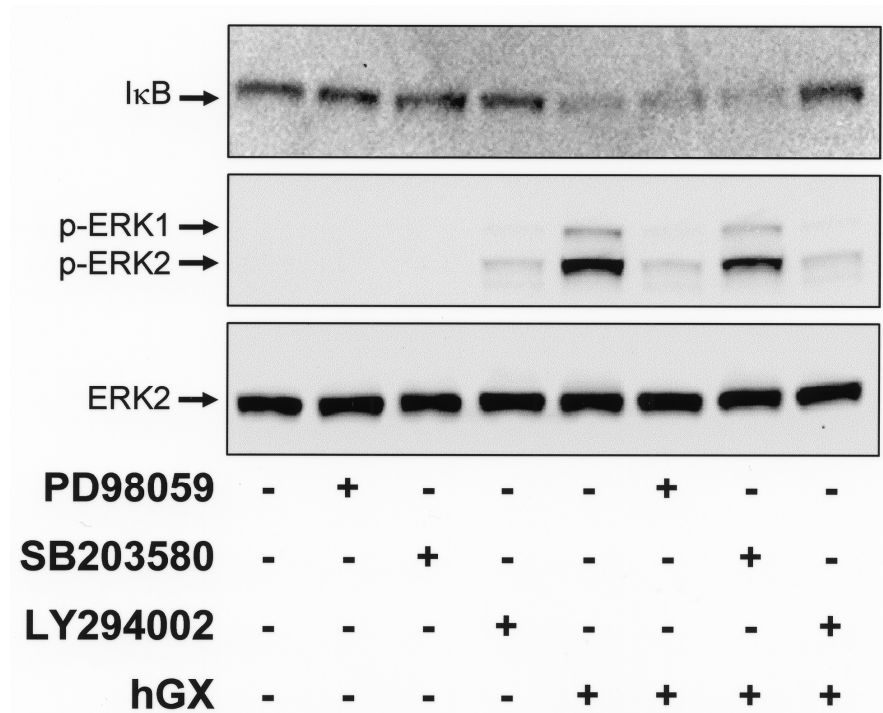


Figura 19: Effetto degli inibitori di p38, ERK1/2 e PI3K sulla fosforilazione delle MAP chinasi e sulla degradazione di IκB indotta dalla hGX negli HLM.

Le cellule sono state preincubate (37°C, 1 ora) con SB203580 (30 μM), PD98059 (50 μM), LY294002 (30 μM) e poi stimolati (37°C, 60 min) con hGX (10 μg/ml). Il western blot è stato eseguito con anticorpi anti-IκBα (primo gel), anti-fosfo-ERK1/2 (secondo gel) ed anti-fosfo-p38 (non mostrato). Le membrane strippate sono state incubate successivamente con un anticorpo anti-ERK2 (terzo gel) per confermare un uguale contenuto di proteine per campione. I western blot sono rappresentativi di quattro esperimenti separati.

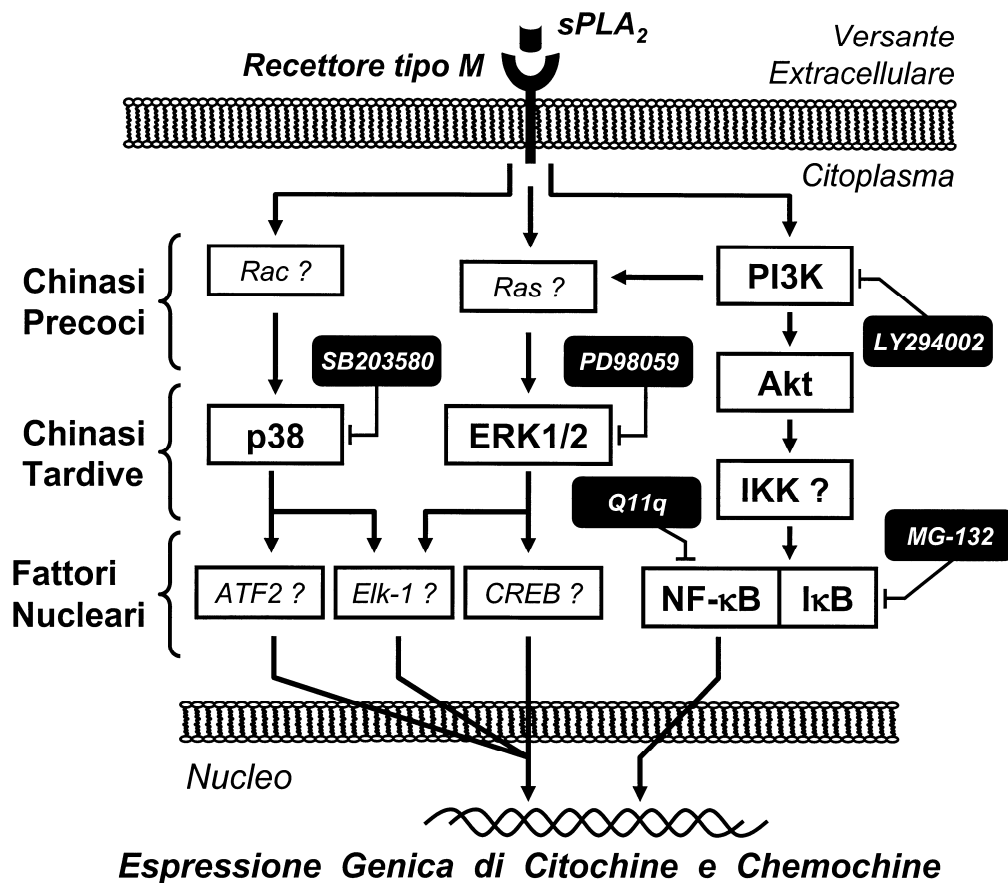


Figura 20: Schema ipotetico degli eventi attivati nei macrofagi umani dalla interazione delle sPLA₂ con il recettore tipo M.

L'interazione della sPLA₂ con il recettore tipo M espresso sulla membrana dei macrofagi umani attiva diverse cascate di trasduzione del segnale che sono coinvolte nella attivazione dell'espressione genica che determina la produzione di citochine e chemochine.

Tabella I - Classificazione delle Fosfolipasi A₂

Gruppo	Sottogruppo	Specie	Origine	Classe	Attività idrolitica*
I	A	Serpenti	—	Secretoria	Si
	B	Mammiferi	Polmone/rene/pancreas/milza	Secretoria	No
II	A	Mammiferi/Serpenti	Polmone/placenta/siero/milza/timo/midollo osseo/sinovia/ condrociti/cheratinociti/piastrine/mastociti/macrofagi	Secretoria	No
	B	Serpenti	—	Secretoria	ND
	C	Roditori	—	Secretoria	No
	D	Uomo/Roditori	Organi linfoidi/colon/pancreas/endotelio/ eosinofili/cheratinociti/mastociti	Secretoria	No
	E	Uomo/Roditori	Cervello/cuore/polmone/placenta/muscolo liscio	Secretoria	No
	F	Uomo/Roditori	Rene/fegato/placenta/sinovia/testicolo/timo/endotelio	Secretoria	No
III		Uomo/Roditori	Cuore/rene/fegato/muscolo scheletrico	Secretoria	Si
IV	A/B/C	Mammiferi	La maggior parte delle cellule di mammifero	Citosolica	-
V		Uomo/Roditori	Polmone/cuore/placenta/epitelio respiratorio/condrociti/ fibroblasti/cheratinociti/macrofagi/neutrofili	Secretoria	Si
VI	A-1/A-2/B	Mammiferi	La maggior parte delle cellule di mammifero	Citosolica	-
VII (Acetilidrolasi)		Mammiferi	Plasma/fegato/rene/macrofagi	Secretoria	ND
VIII	A/B	Uomo	Cervello	Citosolica	-
IX		Lumaca marina	—	Secretoria	ND
X		Uomo/Topo	Intestino/polmone/milza/timo/epitelio e endotelio respiratorio/macrofagi/cheratinociti/neutrofili	Secretoria	Si
XI	A/B	Piante	—	Secretoria	ND
XII	A	Uomo/Topo	Cuore/cervello/intestino/rene/fegato/polmone/ pancreas/placenta/muscolo scheletrico	Secretoria	No
	B	Uomo	Intestino/rene/fegato	Secretoria	No

* Determinata come secrezione di acido arachidonico da monociti e macrofagi umani incubati con sPLA₂ esogene (47, 55) . ND: non determinata

